

Subprodutos da indústria de hortofrutícolas minimamente processados: caracterização e valorização do potencial bioativo e energético

Mónica Isabel Guerreiro Baeta

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento dos Alimentos

Orientadora: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Coorientadora: Doutora Isabel Paula Ramos Marques

Coorientadora: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Rita do Amaral Fragoso, Professora Auxiliar Convidada do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu, Investigadora Auxiliar do
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais apresento o meu mais profundo agradecimento:

Em primeiro lugar, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, na pessoa do Doutor Carlos Santos, pela oportunidade que me concedeu na realização deste trabalho e pelo apoio que manifestou durante a sua realização.

De uma forma muito especial, à minha orientadora, Doutora Marta Abreu, pelo entusiasmo e motivação na sua orientação, exemplo de profissionalismo, apoio incansável, força, boa disposição e total disponibilidade demonstrada em todas as fases deste trabalho.

À Doutora Isabel Paula, não menos importante, por toda a orientação, correções e pelo apoio demonstrado. Agradeço todos os estímulos e desafios para a realização deste trabalho, bem como a amabilidade, amizade e boa disposição em todos os momentos.

À Professora Doutora Margarida Moldão Martins, minha coorientadora, pela disponibilidade, assim como por todo o apoio e compreensão. Além disso, um agradecimento especial pelos conselhos, incentivo e disponibilidade demonstrados ao longo destes anos enquanto minha docente.

À Engenheira Carla Alegria, que desde o primeiro dia demonstrou a sua disponibilidade no acompanhamento e orientação deste trabalho. Pela sua preciosa ajuda, visão crítica, colaboração, esclarecimento de dúvidas, sugestões, correções, partilha de conhecimento, amizade e muita paciência em todas as fases do trabalho, o meu muito obrigado. As suas palavras de força e de otimismo foram essenciais para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação.

À Engenheira Ana Paula Batista pela sua inteira disponibilidade na realização dos ensaios experimentais e esclarecimento de dúvidas, bem como pelo seu incentivo, enorme compreensão, conhecimentos transmitidos e por ter sempre uma palavra amiga.

À Elisa Silva por todo apoio e carinho, amizade e paciência diária que me manifestou. Agradeço, de forma muito especial, a partilha de muitos bons momentos e a preocupação durante momentos de maior aflição. O seu apoio foi muito importante para continuar e finalizar o trabalho desenvolvido.

À Patrícia Rodrigues, Sónia Andrade e Cátia Ribeiro pela amizade, convívio diário e por todo apoio. Agradeço todos os momentos de risos e boa disposição que me proporcionaram, que permitiram abstrair momentaneamente dos problemas que surgiam e permitiram regressar ao trabalho com incentivo e maior concentração.

À empresa CAMPOTEC, S.A. pela proposta do tema, bem como pela total disponibilidade de materiais e meios ao desenvolvimento do trabalho.

A todos os meus amigos do ISA e fora dele, que me acompanharam desde o início do meu percurso académico. Sem a sua amizade e companheirismo todos estes anos não teriam sido a mesma coisa.

À minha família que me fez tornar na pessoa que sou hoje, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço, e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente me oferecem. Sem eles nada disto seria possível.

A todos os que não foram mencionados, mas que não foram esquecidos, o meu

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Foram testadas duas vias de valorização de subprodutos hortofrutícolas (SHF) de uma indústria de hortofrutícolas minimamente processados: potencial em compostos bioativos e produção de biogás por digestão anaeróbia. Foi caracterizado um volume de 138 t/mês de subprodutos gerados definindo-se quatro classes com base na composição principal: I – Batata (42,8 t/mês), II – Cenoura (15,2 t/mês), III – Frutos (24,8 t/mês) e IV – Folhosas (55,2 t/mês). Apenas as classes III e IV demonstraram potencialidade na recuperação de compostos bioativos, com teores em compostos fenólicos totais de cerca de 328,9 mg ET.100 g⁻¹ e 204,9 mg ET.100 g⁻¹, respetivamente. A digestão anaeróbia de SHF (*Batch*, 50 dias, 37 °C) foi estudada para uma mistura representativa da proporção média de subprodutos gerados (Mix) utilizando uma lama de ETAR como inóculo do processo. Foi também avaliado o efeito da adição de duas concentrações de soro de leite (0,9% e 2,6% m/m de proteína bruta) como substratos complementares (SL₁ e SL₂). A produção de biogás contabilizou 60 a 70% de metano, tendo-se obtido eficiência no processo apenas até ao 29º dia para todas as misturas (I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂) com rendimentos de ca de 3 L de metano por litro de mistura.

Palavras-chave: Hortofrutícolas, subprodutos, compostos bioativos, compostos fenólicos, biogás, metano.

ABSTRACT

For fruit and vegetable byproducts from the fresh-cut industry (SHF) two valorization alternatives were tested: recovery of bioactive compounds and biogas production by anaerobic digestion. From the total of byproducts produced by the factory (138 tons/month) four classes were defined based on the main composition: I - Potato (42,8 ton/month), II - Carrot (15,2 ton/month), III - Fruits (24,84 ton/month) and IV - Leafs (55,2 ton/month). Only classes III and IV demonstrated a valuable source of antioxidant compounds with a total phenolic compound of $328,9 \pm 25,5 \text{ mg ET.100 g}^{-1}$ and $204,9 \pm 38,2 \text{ mg ET.100 g}^{-1}$, respectively. The anaerobic digestion of SHF (*Batch*, 50 days, 37 °C) was studied for a representative mixture of daily fruits and vegetables byproducts production (Mix) with sludge as inoculum. It was also evaluated the effect of the addition of whey in two concentrations (0,9% and 2,6% m/m of crude protein) as complementary substrates (SL₁ and SL₂). All the mixtures tested (I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂) produced biogas at these experimental conditions with 60 to 70% of methane. The process was only efficient until day 29th to all mixtures with yields of about 3 L of methane for liter of mixture.

Key words: Fruits and vegetables, byproducts, bioactive compounds, phenolic compounds, biogas, methane.

EXTENDED ABSTRACT

Fresh-cut consumption is increasing due to the rising public demand for convenience and awareness of fruits and vegetables benefits. It is also known that the entire tissue of fruits and vegetables is rich in bioactive compounds, such as phenolic compounds, carotenoids, and vitamins, which have a lot of health benefits.

The fresh-cut fruit and vegetables industry deals with the perishable character of its products and the large percentage of byproducts, such as peels, seeds, and unused flesh that are generated by different steps of the industrial process. A disposal of these materials usually represents a problem that is further aggravated by legal restrictions.

Thus new aspects concerning the use of these wastes as byproducts for further exploitation on the production of food additives or supplements with high nutritional value have gained increasing interest because these are high-value products and their recovery may be economically attractive. In most cases, the wasted byproducts can present similar or even higher contents of antioxidant and antimicrobial compounds than the final produce can.

Fruits and vegetables byproducts can also be seen as a biomass resource. The most promising alternative to incinerating these materials is to digest its organic matter using the anaerobic digestion. The main advantage of this process is the production of biogas, which have a lot of uses such as to produce electricity. A valuable effluent is also obtained, which eventually can be used as an excellent soil conditioner after minor treatments. However, these materials have some limitations when applied at the anaerobic digestion, such as their rapid acidification and an unbalanced C/N. The addition of a complementary substrate to the process can be advantageously applied as it provides the required conditions for a successful anaerobic digestion.

Given the above, one of the objectives of this study was to quantify the volumes of the byproducts produced from an industry of minimal processed fruits and vegetables (SHF) to identify and characterize their bioactive potential in order to consider them potential sources for the recovery of bioactive compounds of interest. It was also wanted to evaluate the potential of a mixture of these byproducts as substrate for the production of biogas through anaerobic digestion processes. Different substrate formulations for anaerobic digestion were considered: representative mixture of daily fruits and vegetables byproducts production (Mix) and mixtures of Mix with whey (Mix+SL₁ and Mix+SL₂) with two concentrations (0,9% and 2,6% m/m of crude protein).

It was concluded that the industry studied produces above 138 ton/month byproducts which justifies the search for new recovery technologies instead of the usual destiny through the animal feed. The total of byproducts produced can be ordered from the main composition and volume generates as Leafs (55,2 ton/month), Potato (42,8 ton/month), Fruits (24,8 ton/month) and Carrot (15,2 ton/month).

Fruits and Leafs were the two classes which revealed high potential to the extraction of bioactive compounds, especially phenolic compounds ($328,9 \pm 25,5$ mg TE.100 g⁻¹ e $204,9 \pm 38,2$ mg TE.100 g⁻¹, respectively). These byproducts also have low pH ($4,1 \pm 0,1$ and $5,5 \pm 0,1$, respectively), low total solid content ($7,9 \pm 0,3$ °Brix and $7,1 \pm 0,3$ °Brix) and high moisture ($90,0\% \pm 0,7$ and $87,2\% \pm 0,7$).

About the anaerobic digestion it was concluded that all the mixtures tested produced biogas at the experimental conditions tested (*batch*, 50 days, 37 °C) with above 60 to 70% of methane. The production of biogas/methane was efficient until 29th day. At this day the yields obtained were about 3 L of methane for liter of mixture to all the mixtures tested. This study was inconclusive about the complementarity of Mix with whey, however considering the DA of mixture I+Mix the total of byproducts produced for month at the factory in study (138 ton) have an estimated yield of 374 m³ of methane/month.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
EXTENDED ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
ENQUADRAMENTO DO TRABALHO	xiv
I - REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1. Impacto dos subprodutos de origem vegetal	2
2. Subprodutos hortofrutícolas como fonte de compostos bioativos.....	6
2.1. Subprodutos do processamento mínimo de hortofrutícolas	7
2.2. Composição bioativa dos subprodutos.....	12
2.2.1. Compostos Fenólicos	14
2.2.2. Carotenóides	15
3. Subprodutos hortofrutícolas como fonte energética.....	17
3.1. Processo de digestão anaeróbia	18
3.2. Subprodutos hortofrutícolas como substrato à digestão anaeróbia	23
3.2.1. Pré-tratamentos.....	24
3.2.2. Complementaridade de substratos	25
3.3. Biogás	26
II - TRABALHO EXPERIMENTAL	29
4. MÉTODOS.....	30
4.1. Métodos Analíticos.....	30
4.1.1. pH	30
4.1.2. Teor de Sólidos Solúveis.....	30
4.1.3. Cor CIELab.....	30
4.1.4. Teor de Humidade.....	31
4.1.5. Conteúdo Fenólico Total	32

4.1.6. Conteúdo em Carotenóides Totais.....	32
4.1.7. Capacidade Antioxidante	32
4.1.8. Carência Química de Oxigênio	33
4.1.9. Azoto Total	33
4.1.10. Azoto Amoniacal.....	34
4.1.11. Sólidos Totais/Sólidos Voláteis	34
4.1.12. Sólidos Suspensos Totais/Sólidos Suspensos Voláteis	34
4.1.13. Ácidos Gordos Voláteis	34
4.1.14. Caracterização da composição do biogás	35
4.2. Métodos Estatísticos.....	35
5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
5.1. Identificação e Caracterização do Potencial Bioativo dos Subprodutos	36
5.1.1. Objetivos.....	36
5.1.2. Metodologias para a identificação das classes de subprodutos	36
5.1.2.1. Resultados e discussão.....	37
5.1.3. Metodologias para a caracterização das classes de subprodutos	42
5.1.3.1. Resultados e discussão.....	42
5.1.4. Conclusões intercalares	48
5.2. Digestão anaeróbia: valorização dos subprodutos pela produção de biogás.....	49
5.2.1. Objetivos.....	49
5.2.2. Materiais e metodologias.....	49
5.2.3. Resultados e Discussão	54
5.2.4. Conclusões intercalares	68
III – CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6. Conclusões	70
7. Linhas de investigação futura	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de compostos funcionais presentes em frutos.....	6
Tabela 2. Subprodutos gerados na indústria de hortofrutícolas minimamente processados	11
Tabela 3. Compostos fenólicos em diferentes tecidos de hortofrutícolas (mg/ 100 g peso fresco)	12
Tabela 4. Extração de compostos bioativos de diferentes subprodutos	13
Tabela 5. Processo de digestão anaeróbia.....	18
Tabela 6. Rendimento em biogás dos principais componentes	21
Tabela 7. Composição do biogás.....	26
Tabela 8. Classificação do nível de escurecimento (WI) da amostra	31
Tabela 9. Padrões de composição conhecida na avaliação da composição do biogás.....	35
Tabela 10. Matérias-primas utilizadas na preparação dos diferentes produtos hortofrutícolas minimamente processados laborados na empresa	39
Tabela 11. Natureza dos desperdícios gerados e estimativas médias (%) por tipo de matéria- prima.....	40
Tabela 12. Identificação das classes de subprodutos: I - Batata, II - Cenoura, III - Frutos e IV – Folhosas, e dos volumes (%) produzidos	40
Tabela 13. Representatividade mensal das diferentes matérias-primas e das classes de subprodutos.....	41
Tabela 14. Resultados médios (\pm DP) dos parâmetros TH, pH e TSS, nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas).....	43
Tabela 15. Resultados médios (\pm DP) dos parâmetros CIELab ($^{\circ}$ h e índice WI) da cor nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas).....	44
Tabela 16. Capacidade antioxidante (AOxT) e conteúdo em fenólicos totais (CFT) e carotenoides totais (CCT) nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-cenoura, III- Frutos e IV-Folhosas).....	47
Tabela 17. Composição percentual dos soros de leite nos seus principais componentes (SL ₁ e SL ₂).....	50
Tabela 18. Caracterização dos subprodutos e do inóculo	51
Tabela 19. Composição percentual das misturas ensaiadas	51
Tabela 20. Caracterização das misturas a digerir e da solução Controlo	52
Tabela 21. Eficiências de remoção do processo de digestão.....	57

Tabela 22. Total de ácidos gordos voláteis expressos em ácido acético e em CQO. Eficiência total de remoção.....	58
Tabela 23. Valores médios dos ácidos gordos voláteis (mg.L^{-1}) das misturas no início e no final do processo de digestão	59
Tabela 24. Composição do biogás após um mês e no final do ensaio.....	63
Tabela 25. Rendimentos do processo (massa total em digestão)	63
Tabela 26. Produção de biogás por digestão anaeróbia de subprodutos hortofrutícolas.	66
Tabela 27. Rendimento do processo (substrato em digestão)	656

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Subsectores do sector das indústrias de processamento de matérias-primas vegetais	2
Figura 2. Gestão do material vegetal gerado no processamento industrial	3
Figura 3. Valorização de subprodutos origem vegetal.....	4
Figura 4. Benefícios para a saúde de alimentos funcionais com a adição de antioxidantes naturais.....	7
Figura 5. Evolução do valor das vendas do segmento de Preparação e Conservação de Frutos e Produtos Hortícolas em Portugal	8
Figura 6. Diagrama tecnológico geral do processamento mínimo de hortofrutícolas.....	10
Figura 7. Estrutura base dos compostos fenólicos.	14
Figura 8. Estruturas gerais dos principais flavonóides.....	14
Figura 9. Estruturas representativas de carotenóides: (a) carotenos; (b) xantofilas	15
Figura 10. Ranking de produção de Biogás na Europa, em tep/1000 hab, no ano de 2009.....	17
Figura 11. Sistemas de digestão anaeróbia.....	20
Figura 12. Relação entre o teor em lenhina e celulose e a biodegradabilidade (%) da matéria orgânica.....	23
Figura 13. Equivalência energética bruta do biogás com 65% de metano, apenas com base no PCI e sem entrar em conta com eficiências de conversão	27
Figura 14. Principais tipos de utilizações do biogás	28
Figura 15. Exemplos de produtos hortofrutícolas minimamente processados laborados na empresa. a) Mistura de vegetais para saladas; b) Maçã fatiada; c) Cenoura ripada; d) Alface cortada.....	37
Figura 16. Etapas de eliminação de matéria vegetal.....	38
Figura 17. Classes de suprodutos: a) I - Batata; b) II - Cenoura; c) III – Frutos; d) IV – Folhosas	41
Figura 18. Teor fenólico total (mg EAC.100 g ⁻¹) avaliado nas diferentes classes de subprodutos: I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas.....	45
Figura 19. Teor de carotenóides total (mg β-caroteno eq.100 g ⁻¹) avaliado nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-Cenoura, III-Folhas e IV-Frutos).	46
Figura 20. Capacidade antioxidante relativa às fracções hidrofílica (AOxH); lipofílica (AOxL) e total (AOxT) avaliadas nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas)	47

Figura 21. (a) Subprodutos e (b) Formulação das misturas a digerir por digestão anaeróbia. ..	50
Figura 22. Unidade de digestão estabelecida.....	52
Figura 23. Esquema da preparação das soluções do processo de digestão	53
Figura 24. Caracterização das diferentes soluções no início e no final do processo de digestão: a) pH; b) CQO; c) ST; d) SV; e) Azoto total e f) Azoto Amoniacal.....	56
Figura 25. Produção cumulativa de biogás (mL) para as soluções testadas (I+Mix, I+Mix + SL ₁ , I+Mix + SL ₂) e para o Controlo.....	61
Figura 26. Produção de metano (mL) para as soluções testadas (I+Mix, I+Mix + SL ₁ , I+Mix + SL ₂) e para o Controlo.....	61
Figura 27. Fenómeno de coloração vermelha após o ensaio de digestão	62
Figura 28. Potencial de produção de energia por cogeração na fábrica	67

LISTA DE ABREVIATURAS

De seguida, apresenta-se uma listagem das abreviaturas utilizadas neste trabalho, organizadas por ordem alfabética.

AGV	Ácidos Gordos Voláteis	PM	Processamento Mínimo
AOx	Capacidade Antioxidante	PPO	Polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1)
AOxH	Capacidade Antioxidante Hidrofílica	PTN	Condições normais de Pressão e Temperatura (1 atm e 0°C)
AOxL	Capacidade Antioxidante Lipofílica	SHF	Subprodutos Hortofrutícolas
AOxTotal	Capacidade Antioxidante Total	SL	Soro de Leite
C/N	Relação Carbono/Azoto	SST	Sólidos Suspensos Totais
CCT	Conteúdo Carotenóides Total	SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
CFT	Conteúdo Fenólico Total	ST	Sólidos Totais
CQO	Carência Química de Oxigénio	SV	Sólidos Voláteis
CQO _r	Carência Química de Oxigénio removido	SV _i	Sólidos Voláteis iniciais
DA	Digestão Anaeróbia	SV _r	Sólidos Voláteis removidos
DP	Desvio Padrão	TH	Teor de Humidade
EAC	Equivalentes de Ácido Clorogénico	TSS	Teor de Sólidos Solúveis
Eq.	Equação	WI	<i>Whiteness Index</i> (Índice de escurecimento)
ET	Equivalentes de Trolox		
HF	Hortofrutícolas		
HMP	Hortofrutícolas Minimamente Processados		
I	Inóculo		
Mix	Mistura de subprodutos hortofrutícolas		

ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

No sector agroindustrial a valorização de subprodutos representa uma tendência de interesse crescente por parte das empresas de processamento de matérias-primas vegetais, uma vez que geram quantidades importantes de matéria vegetal desperdiçada. Esta situação assume uma importância crucial sobretudo quando se trata de um sector com elevado peso na economia, como é o caso da indústria de hortofrutícolas (INE, 2010).

Estes materiais são descartados nas operações de preparação, preliminares e comuns à maioria dos processos de transformação de hortofrutícolas, nomeadamente nas operações de seleção, descasque e corte, com a consequente eliminação de diversos tipos de matéria vegetal, tais como, cascas, sementes, talos, entre outras partes não edíveis. A indústria de hortofrutícolas minimamente processados (produtos IV gama) regista um contínuo crescimento na produção deste tipo de materiais (Vasconcelos, 2005). Nesta atividade industrial a produção de material vegetal sólida descartada pode ascender em média a 40 % do volume de matéria-prima laborada, assumindo estas perdas um custo económico relevante.

O material vegetal descartado caracteriza-se por ser muito perecível em virtude dos elevados teores em matéria orgânica associados ao elevado teor de humidade (70-90%) e à elevada contaminação microbiológica (Bouallagui *et al.*, 2005). Esta última questão coloca problemas adicionais na ótica da segurança alimentar uma vez que a sua presença nas linhas de fabrico representa um foco de contaminação. A rápida eliminação destes materiais para fora das zonas de laboração faz parte integrante dos sistemas de gestão da qualidade alimentar (HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*). Acresce que as condições impostas para o armazenamento de materiais de elevada perecibilidade até à sua expedição da unidade fabril envolvem, só por si, custos empresariais elevados.

O aproveitamento deste tipo de matéria vegetal através de abordagens tradicionais como a utilização na alimentação animal, a incineração e a compostagem, nem sempre demonstra eficiência acarretando custos. Nos últimos anos têm sido estudadas e introduzidas vias alternativas para a transformação destes produtos, acrescentando-lhes valor e tornando possível reduzir os custos associados do respetivo tratamento, armazenamento e transporte. A incorporação de metodologias de valorização de subprodutos em associação ao processo produtivo principal contribui ainda para diversificar os produtos e reduzir a emissão de resíduos sólidos.

A valorização destes materiais, na ótica de subprodutos ao invés de resíduos, insere-se no crescente interesse de promover o desenvolvimento sustentável e a proteção ambiental e em aumentar a competitividade empresarial.

A composição da matéria vegetal eliminada caracteriza-se por possuir quantidades elevadas de substâncias antioxidantes naturais de interesse nutricional e biológico, designadamente compostos fenólicos, pigmentos, fibras, vitaminas e sais minerais. É do conhecimento científico que as cascas e as sementes são os locais onde se concentram os teores mais elevados de

compostos bioativos de interesse face às partes edíveis (Ayala-Zavala *et al.*, 2010). Em consequência constituem substratos promissores e baratos para a extração de fitoquímicos de utilização diversificada quer na própria indústria alimentar quer noutro tipo de indústrias, como a farmacêutica e a cosmética (Martin, 1998).

Por outro lado, a natureza destes subprodutos no que respeita à elevada biodegradabilidade e ao elevado teor de humidade demonstram igualmente características adequadas para a produção de biogás, através de processos de digestão anaeróbia (Bouallagui, *et al.* 2005). O biogás pode ter diversas aplicações, entre as quais o fornecimento de redes de gás, a produção de energia elétrica ou a combustão direta.

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar uma abordagem integrada para a valorização de subprodutos de uma indústria de hortofrutícolas minimamente processados. Estes produtos foram encarados nas óticas de potenciais substratos para a extração de compostos bioativos e para a produção de uma fonte energética (biogás) através do processo de digestão anaeróbia.

I - REVISÃO DA LITERATURA

1. Impacto dos subprodutos de origem vegetal

As agroindústrias portuguesas contemplam diversos sectores de entre os quais o sector das indústrias de processamento de matérias-primas vegetais. Mais de metade das instalações referenciadas neste sector são Lagares, sendo o subsector do Vinho (adegas e destilarias) o segundo mais importante. O subsector dos Frutos e Hortícolas (F&H) também representa um número significativo de instalações e todos os restantes subsectores correspondem a pouco mais de 10% (Figura 1).

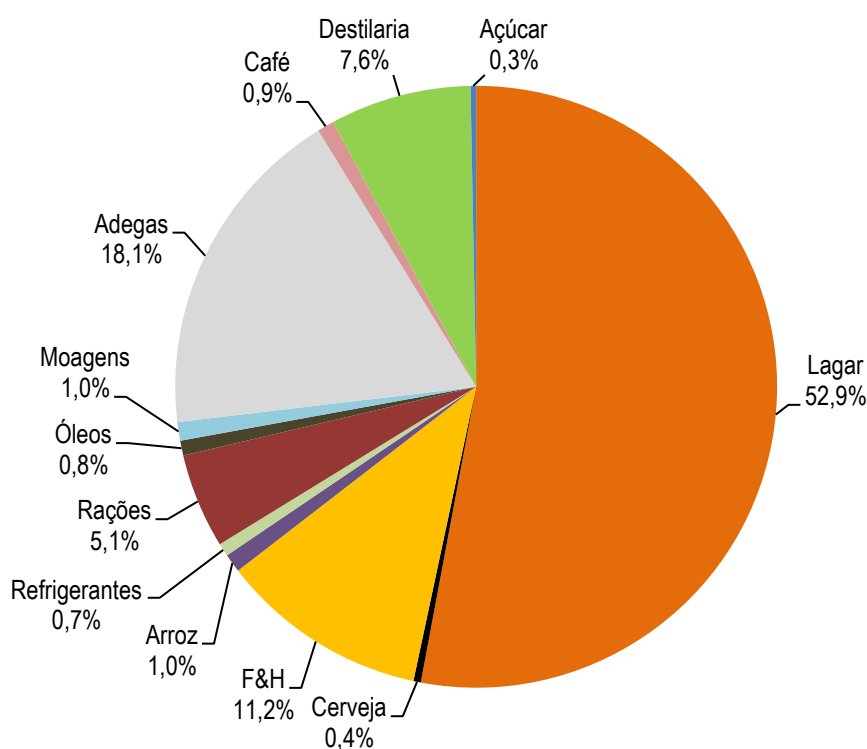


Figura 1. Subsectores do sector das indústrias de processamento de matérias-primas vegetais (Total = 1381 empresas nacionais do sector) (Duarte et al., 2007)

O processamento de matérias-primas de origem vegetal origina grandes quantidades de material descartado que pode constituir um sério problema ambiental, em particular quando sujeito a procedimentos incorretos de aproveitamento e/ou eliminação. Correntemente, a produção mundial de material vegetal (matérias-primas vegetais agroindustriais e florestais) é estimada em valores que excedem os 100 triliões de kg (Brigewater, 2011).

A estratégia para uma correta gestão dos materiais descartados neste sector centra-se na prevenção, evitando a geração de grandes volumes dos mesmos. Para o conseguir, os esforços devem centrar-se no incremento da eficiência dos processos e nos planos de prevenção, através da aplicação de tecnologias de minimização. Depois de se otimizar a redução deve-se potenciar a valorização dos volumes produzidos e, apenas em última instância, proceder à sua eliminação (Figura 2) (VALUE, 2012).



Figura 2. Gestão do material vegetal gerado no processamento industrial (VALUE, 2012)

Nos últimos anos tem-se verificado uma tendência crescente para a valorização do material vegetal, acompanhando a evolução de uma legislação ambiental cada vez mais restritiva. Os materiais descartados neste tipo de indústrias, muitas vezes designados erroneamente por resíduos e sujeitos a eliminação sem qualquer aproveitamento, apresentam-se assim como subprodutos, ou seja, produtos que apesar de não serem o objetivo final do processo produtivo principal podem ser valorizados por diferentes vias (FIPA, 2007).

Neste contexto, os diversos tipos de valorização destes subprodutos podem contribuir para acrescentar valor económico na linha de produção das empresas do sector, podendo mesmo constituir uma excelente oportunidade de negócio.

A valorização dos materiais de origem vegetal pode ser classificada em três vertentes: valorização material, valorização orgânica e valorização energética, como esquematizado na Figura 3 (AEP, 2011 e Decreto Lei nº73/2011).

A **valorização material** corresponde à reciclagem, sendo na ótica industrial aplicável na reincorporação dos materiais em processos de fabrico da mesma empresa ou no envio dos mesmos para outras unidades industriais ou atividades que os incorporem nos seus processos produtivos. Consta também neste tipo de valorização a recuperação de compostos presentes nos referidos materiais.

Na **valorização orgânica** ocorre a transformação da fração orgânica presente nos subprodutos, dando origem a um composto semelhante ao solo ou a biocombustíveis líquidos ou gasosos. Por último, a **valorização energética** consiste na recuperação de energia, que pode ocorrer por incineração dos resíduos ou por combustão de gases por eles produzidos.

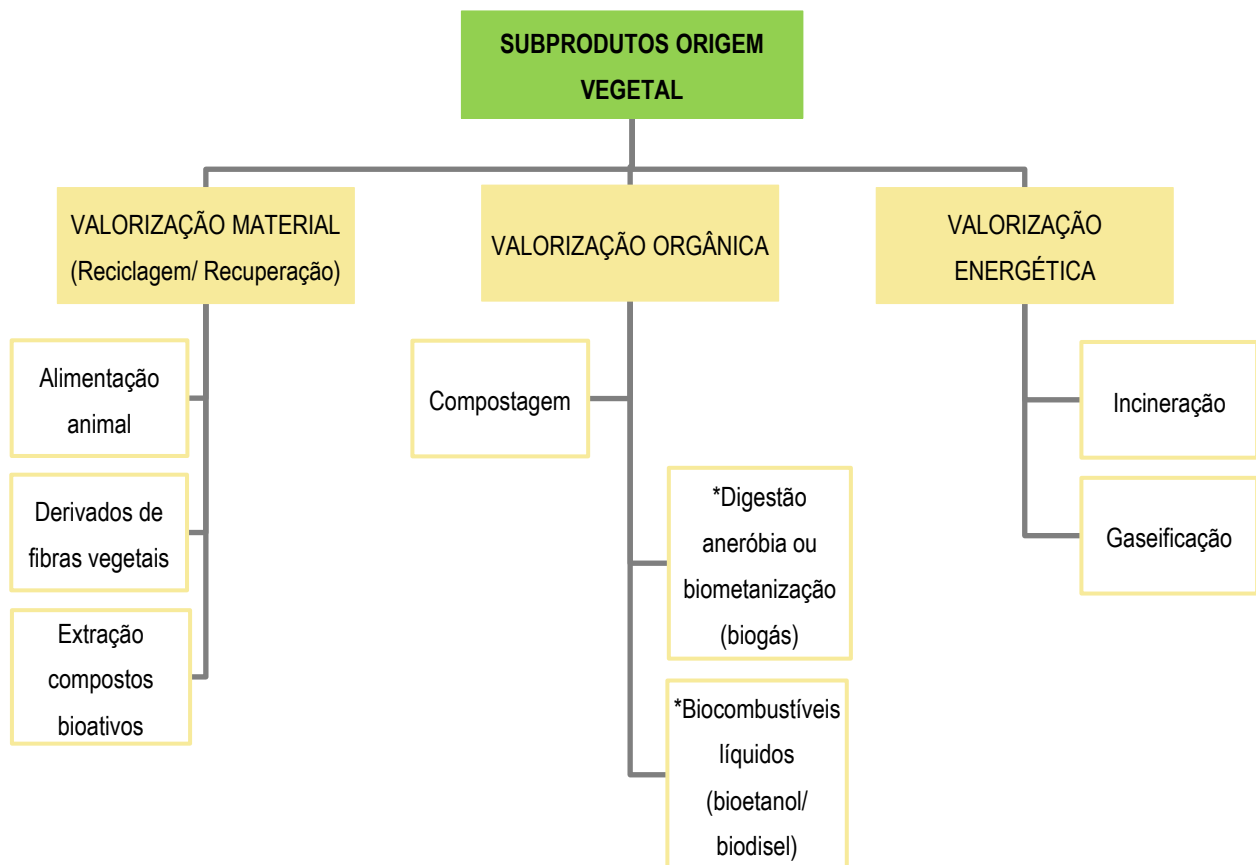


Figura 3. Valorização de subprodutos origem vegetal (VALUE, 2012 e AEP, 2011)

*Processos com potencial energético

Tipicamente, uma parte substancial dos subprodutos produzidos no sector dos Frutos e Hortícolas, consiste da matéria-prima original incluindo a pele e as sementes dos frutos, casca, talos, etc.. Usualmente, e apesar do seu valor significativo, estes subprodutos são comumente sub aproveitados e o seu potencial valor é frequentemente perdido.

As vias tradicionais para a valorização deste tipo de subprodutos são a alimentação animal, a incineração e a compostagem, embora elas nem sempre demonstram eficiência e acarretem custos muitas vezes mais elevados dos que os que são estimados pelas próprias empresas.

A título de exemplo o repiso de tomate tem atualmente um valor comercial nulo, a polpa de alfarroba apresenta um valor próximo dos 120 €/t, a casca de amêndoa e a casca de pinhão, respetivamente cerca de 70 e 30 €/t (Duarte *et al.*, 2007).

De acordo com Laufenberg (2003), a utilização de matéria vegetal provenientes do processamento de frutos e vegetais na alimentação animal configura, na maioria das vezes, a substratos alimentares desequilibrados associados a diversas limitações em termos nutricionais. Cavaleiro (2011), por exemplo, refere que a utilização de subprodutos provenientes do processamento mínimo de batata é inadequada para a alimentação animal devido ao teor de compostos fenólicos e de glicoalcalóides.

A via de incineração, como forma de valorização deste tipo de produtos, também não constitui uma alternativa viável tendo em conta o baixo calor específico de combustão e os elevados teores em água inerentes. Esta via acarreta ainda impactos ambientais negativos entre os quais a libertação de gases e a produção de águas residuais e cinzas (AEP, 2011).

Por sua vez, os processos de compostagem exigem, na maioria das vezes, a aplicação de pré-tratamentos como a remoção de água e a neutralização do pH, de forma a garantir melhores condições ao crescimento e desenvolvimento microbiano. É ainda de acrescentar que se encontram associados à compostagem grandes períodos de incubação, o que dificulta a sua aplicação (Schaub e Leonard, 1996).

Acresce que a utilização das referidas vias enquanto processos de valorização de subprodutos de origem vegetal acarreta custos económicos adicionais aos imputados nos pré-tratamentos, nomeadamente custos de armazenamento e de transporte.

Sublinha-se assim a importância de encontrar processos mais eficientes de valorização destes materiais que contribuam para aumentar a receita das indústrias (Wognum *et al.*, 2011).

Atendendo ao facto de a composição orgânica da matéria vegetal dos subprodutos agroindustriais apresentar uma diversidade em compostos fitoquímicos de interesse bioativo, os processos destinados à sua recuperação revestem-se do maior interesse. Também a utilização dos mesmos como substratos para a produção de biogás apresenta-se como um processo de valorização promissor.

2. Subprodutos hortofrutícolas como fonte de compostos bioativos

Na atualidade assiste-se a um interesse crescente na utilização de fitoquímicos naturais em alternativa às substâncias sintéticas de uso corrente na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Esta ideia é suportada pelas preocupações do consumidor sobre a segurança dos produtos que contém químicos sintéticos, sabendo que os mesmos podem causar ou promover efeitos adversos na saúde (Djilas e Canadanovic-Brunet, 2009).

Estudos recentes demonstraram que a maioria dos fitoquímicos presentes nos hortofrutícolas (HF) desempenha funções importantes na saúde humana e por isso recebem a designação de compostos bioativos (Arabbi, 2001).

Neste sentido os resultados de estudos epidemiológicos têm correlacionado o consumo de HF com efeitos benéficos na saúde, tais como, na redução do risco de doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral, bem como na prevenção de certos tipos de cancro. Para além da fibra alimentar, estes benefícios são principalmente atribuídos aos micronutrientes orgânicos, tais como carotenóides, fenólicos, tocoferóis, vitamina C entre outros (Tokuşoğlu, 2011; Pinto, 2010; Okarter e Liu, 2010)

O efeito benéfico para a saúde associado ao consumo de HF resulta principalmente de compostos fitoquímicos com capacidade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996). Na Tabela 1 são apresentados alguns dos componentes alimentares e a respetiva ação na saúde (funcionalidade).

Tabela 1. Exemplos de compostos funcionais presentes em frutos

Classe / Composto	Fonte	Efeito Potencial
Carotenóides		
β-caroteno	Vários frutos	Neutraliza radicais livres responsáveis por danos celulares Contribui para visão saudável
Luteína, Zeaxantina	Citrinos	
Fenólicos		
Antocianinas	Frutos vermelhos	Reforça as defesas antioxidantes; bom funcionamento do cérebro
Flavonoles – catequinas, epicatequinas	Maçãs, Uvas	Bom funcionamento do coração
Procianidinas	Citrinos	Neutraliza radicais livres que danificam as células; Reforça as defesas antioxidantes
Flavononas	Maçã	
Proantocianinas	Maçãs, frutos vermelhos	Funcionamento regular do trato urinário e do coração

(Adaptado de Djilas e Canadanovic-Brunet, 2009)

A alimentação assume desta forma o estatuto de “funcionalidade” pois além de atender às necessidades nutricionais básicas apresenta efeitos adicionais de prevenção ou de inibição no desenvolvimento de doenças crónicas. Alimento funcional é assim um alimento ou um

ingrediente que tem para além do respetivo valor nutritivo um impacto positivo quer na saúde, quer no desempenho físico e mental dos indivíduos (Pinto, 2010).

Para dar respostas a estas exigências do consumidor assiste-se à tendência por parte dos produtores de alimentos da integração nos processos tecnológicos de antioxidantes de origem natural como forma de obter alimentos seguros e funcionais, em alternativa a aditivos de síntese.

Tornou-se evidente que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes naturais, bem como de alimentos enriquecidos com os mesmos, pode assegurar o estado antioxidante desejável e auxilia prevenindo, em consequência, o desenvolvimento de doenças associadas ao *stress* oxidativo (Djilas e Canadanovic-Brunet, 2009). O esquema da Figura 4 representa o benefício para a saúde dos alimentos enriquecidos com antioxidantes naturais.

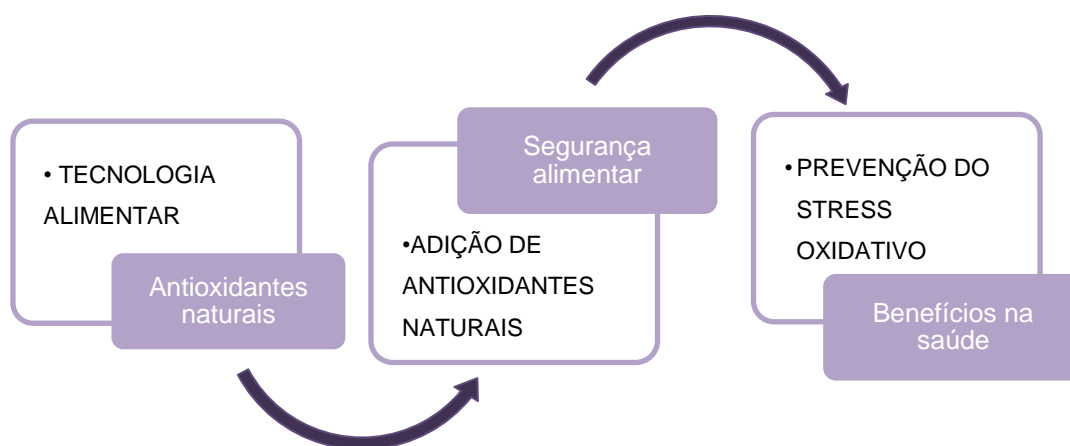


Figura 4. Benefícios para a saúde de alimentos funcionais com a adição de antioxidantes naturais (Adaptado de Djilas e Canadanovic-Brunet, 2009)

2.1. Subprodutos do processamento mínimo de hortofrutícolas

O aumento significativo verificado no consumo de HF nos últimos anos resulta da crescente consciencialização dos seus benefícios na saúde por parte do consumidor.

Na atualidade, a oferta de produtos hortofrutícolas processados - apresentados ao consumidor sob formas muito diversas e com diferentes graus de transformação, constitui uma alternativa ao consumo destes produtos em fresco, sendo uma componente importante na dieta humana (Kagaert *et al.*, 2004).

Os hortofrutícolas minimamente processados (HMP), também conhecidos por produtos frescos cortados ou produtos da IV gama, são produtos refrigerados e embalados, com qualidade sensorial e nutricional próxima das matérias-primas em fresco. Estes produtos são apresentados numa forma pronta a consumir, não necessitando de qualquer preparação culinária prévia ao consumo, oferecendo assim requisitos de conveniência (Kagaert *et al.*, 2004).

Para além da grande aceitação pelo consumidor, estes produtos são igualmente muito solicitados pela indústria de *catering* e pelos serviços institucionais por razões de racionalização de trabalho, de gestão de desperdícios e de requisitos de higiene.

Em Portugal, o segmento de Preparação e Conservação de Frutos e Produtos Hortícolas por Processos, onde se inserem as indústrias de HMP, constitui atualmente um dos segmentos do sector alimentar com maior crescimento (INE, 2010). De acordo com a Figura 5 constata-se que no nosso país, o valor das vendas do mesmo segmento ascendeu a 286 milhões de euros em 2011, mais 40 milhões que no ano anterior. Pela referida análise a taxa de crescimento médio anual (2003-2011) deste segmento foi estimada em 6,8%.

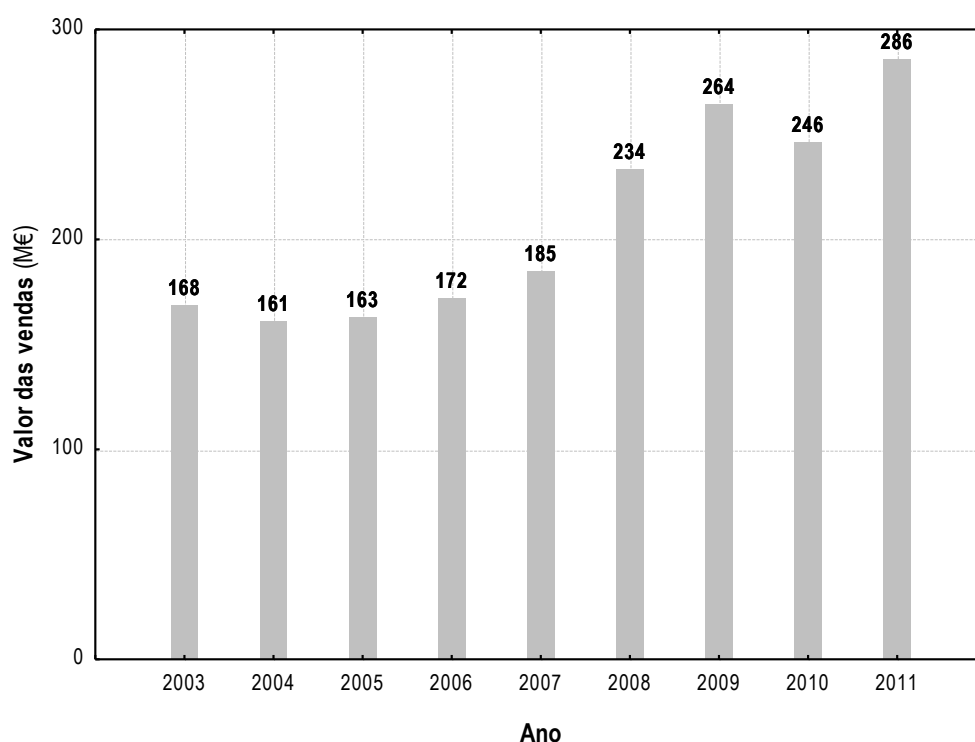


Figura 5. Evolução do valor das vendas do segmento de Preparação e Conservação de Frutos e Produtos Hortícolas em Portugal (adaptado INE, 2012)

A produção de HMP engloba operações de preparação, de conservação e de embalagem. As operações de preparação conducentes à obtenção do produto final pronto a consumir, assentam sobretudo em processos físicos de separação, de mistura e de redução de tamanho. As operações de conservação, que têm por objetivo prolongar o período de vida do produto, agregam por definição um conjunto diverso de metodologias (FAO, 2010).

A taxa de deterioração da qualidade nos HF cortados é muito superior à verificada nos congéneres inteiros. Por estas razões neste tipo de processamento é necessário efetuar uma escolha muito criteriosa das matérias-primas utilizando apenas as que apresentam qualidade superior. Neste sentido são eliminadas quantidades elevadas de matéria-prima não conforme para além das partes não edíveis a que obriga a apresentação final dos produtos 100% comestível.

Por este motivo, estas indústrias encontram-se associadas à produção de grandes quantidades de subprodutos hortofrutícolas (SHF). Estima-se que se produzam ca de 800 000 toneladas/ano face aos HF processados, dos quais fazem parte: matérias-primas não conformes, cascas, sementes, caules e folhas, de diferentes formas e tamanhos (Ayala-Zavala, *et al.*, 2010).

O processamento mínimo (PM) envolve operações unitárias simples ou múltiplas tais como, o descasque e diversos tipos de corte. São ainda submetidos a tratamentos de conservação parcial que pode incluir uma diversidade de metodologias, como a utilização moderada de calor e o uso de aditivos.

De uma forma simplificada, as operações gerais de fabrico são descritas no diagrama geral apresentado na Figura 6, referindo também, de forma concisa, os objetivos e considerações genéricas de cada uma das operações.

De entre o conjunto de operações na tecnologia de PM a receção, a escolha, a calibração, o descasque e a redução de dimensões são operações que geram volumes elevados de materiais descartados, como matérias-primas de qualidade deficiente ou partes não edíveis como cascas, sementes, talos, etc. (FAO, 2010).

Na etapa da receção é efetuada uma escolha preliminar por forma a eliminar hortofrutícolas que apresentem lesões causadas por fatores de natureza fisiológica, fitossanitária e/ou mecânicas decorrentes do transporte. Por sua vez, na escolha e calibração é feita a remoção de matérias-primas de qualidade deficiente ou de calibres inapropriados. Nestas duas etapas o material descartado corresponde essencialmente a produtos inteiros, os quais ainda não sofreram qualquer tipo de processamento.

As etapas de descasque e de redução de dimensões são aquelas que dão origem a grandes volumes de produtos descartados, uma vez que são removidas as partes não edíveis como a casca, folhas, talos, etc. bem como eliminados materiais durante as operações de redução de dimensões.

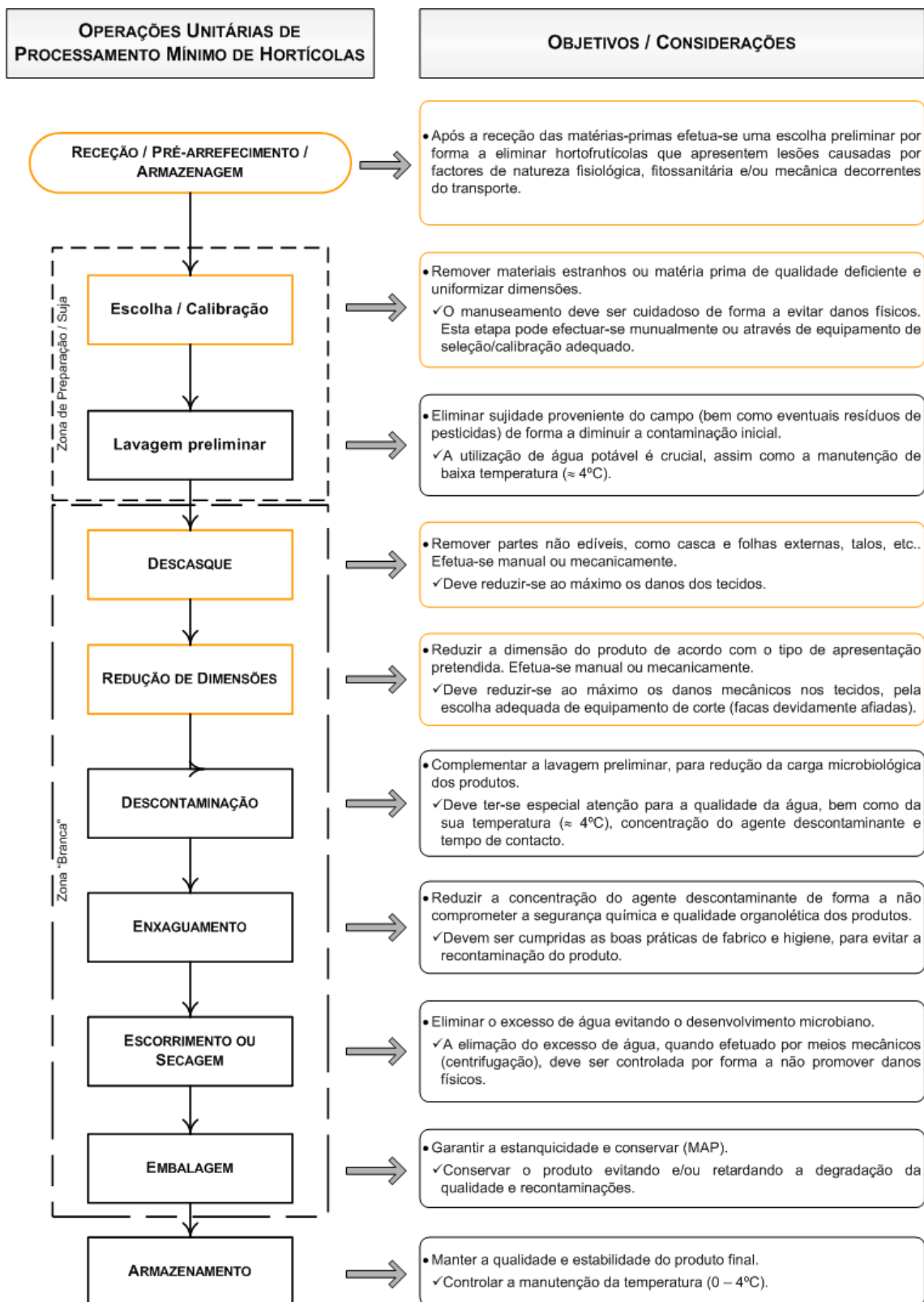


Figura 6. Diagrama tecnológico geral do processamento mínimo de hortofrutícolas (Alegria, 2007)

A natureza destes materiais é muito perecível e difícil de acondicionar, o que representa um importante problema ambiental se não forem devidamente explorados pelas indústrias de processamento mínimo (Ayala-Zavala, *et al.*, 2010; Arvanitoyannis e Varzakas, 2008). Esta

questão coloca problemas adicionais na ótica da segurança alimentar uma vez que a sua presença nas linhas de fabrico representa um foco de contaminação.

Na Tabela 2 encontram-se representadas as percentagens médias de subprodutos gerados nas indústrias de processamento mínimo de hortofrutícolas.

No estudo realizado por Ayala-Zavala (2010) foram caracterizados os volumes de subprodutos gerados na produção de diferentes hortofrutícolas minimamente processados tendo-se concluído que em alguns casos a quantidade de subprodutos gerada excede a quantidade de produto final obtida. No caso do processamento de maçã fatiada são gerados ca de 11% de subprodutos provenientes da polpa e do coração, o que correspondeu a um rendimento de produto final de 89%. Por sua vez, no processamento de ananás, apenas 48% da matéria-prima inicial corresponde à parte edível uma vez que a restante matéria vegetal é eliminada sob a forma de subprodutos (9,1% de coração, 13,5% de casca, 14,5% de polpa e 14,5% da coroa).

Tabela 2. Subprodutos gerados na indústria de hortofrutícolas minimamente processados

Matéria-prima	Subproduto	% Parte Edível	Referência
Maçã	11% (polpa e coração)	89%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2010
Banana	40-50% (casca)	70%	Schieber <i>et al.</i> , 2001
Cenoura	30-40% (casca e bagaço)	60-70%	Schieber <i>et al.</i> , 2001
Goiaba	10-15% (casca e sementes)	85-90%	Schieber <i>et al.</i> , 2001
Manga	13,5% (sementes), 11% (casca) e 17,9% (polpa inutilizável)	58%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2010
Laranja	66% (casca)	44%	Li <i>et al.</i> , 2005
Papaia	8,5% (sementes), 8,5% (casca), e 32,1% (polpa inutilizável)	53%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2010
Maracujá	75% (casca e sementes)	25%	Schieber <i>et al.</i> , 2001
Ananás	9,1% (coração), 13,5% (casca), 14,5% (polpa) e 14,5% (coroa)	48%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2010
Batata	15-40% (casca)	60-85%	Schieber <i>et al.</i> , 2001
Tomate	3-7% (pele e sementes)	93-97%	Schieber <i>et al.</i> , 2001

(Adaptado de Ayala-Zavala et al., 2010; Schieber et al., 2001)

Schieber (2001) concluiu através de estudos similares que no processamento mínimo de batata 15-40% (casca) corresponde a subprodutos e que na indústria da transformação do tomate apenas 3-7% dos materiais (peles e sementes) são desperdiçados.

Os produtos minimamente processados que envolvem perdas $\geq 50\%$ são a banana, a manga, a papaia, o maracujá e o ananás.

2.2. Composição bioativa dos subprodutos

Os subprodutos gerados no processamento mínimo de HF representam uma fonte importante de açúcares, minerais, ácidos orgânicos, fibra, e compostos bioativos tais como os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, e os carotenóides (Djilas e Canadanovic-Brunet, 2009).

Diversos autores constataram ainda que o potencial antioxidante e, em particular, o conteúdo em compostos fenólicos existente nas cascas e sementes dos frutos é superior comparativamente com a parte edível (Tabela 3). Neste sentido, este tipo de materiais constituem matrizes adequadas para a extração de compostos bioativos, com diversas potencialidades de uso.

Tabela 3. Compostos fenólicos em diferentes tecidos de hortofrutícolas (mg/ 100 g peso fresco)

Matéria-prima	Casca/Pele	Polpa	Subproduto gerado	Referência
Maçã	3300*			Wolfe e Liu, 2003
Banana	928*	232*		Someya <i>et al.</i> , 2002
Couve-flor			110-180	Lorach <i>et al.</i> , 2003a
Chicória			77-82	Lorach <i>et al.</i> , 2003b
Toranja	155	135		Gorinstein <i>et al.</i> , 2001
Goiaba	59			Jimenez-Escrig <i>et al.</i> , 2001
Limão	190	164		Gorinstein <i>et al.</i> , 2001
Alface			14-156	Lorach <i>et al.</i> , 2003b
Manga	7000			Larrauri <i>et al.</i> , 1996
Laranja	179	154		Gorinstein <i>et al.</i> , 2001
Pêssego	133,7	41,5		Chang <i>et al.</i> , 2000
Romã	24990	2440		Li <i>et al.</i> , 2005
Tomate cherry	10,4-40	9,20-27		George <i>et al.</i> , 2004

*peso seco (Adaptado de Ayala-Zavala *et al.*, 2010)

O total de compostos fenólicos determinados nas cascas de diferentes citrinos, limões, laranjas e toranjas foi 15% superior face aos teores presentes na polpa dos mesmos (Gorinstein *et al.*, 2001). Por sua vez, de oito cultivares de pêssego estudadas verificou-se que as cascas continham 2 vezes a 2,5 o teor de compostos fenólicos totais verificados na parte edível do produto (Chang *et al.*, 2000). Cascas de maçãs, pêssegos e peras continham o dobro do teor de compostos fenólicos totais face aos determinados na polpa dos mesmos (Gorinstein *et al.*, 2001). A parte edível da banana contém 232 mg/100 g de peso seco em fenólicos, valor que representa 25% do existente na casca (Someya *et al.*, 2002). As cascas da maçã num estudo

realizado por Wolfe (2003) contabilizaram valores acima de 3000 mg/100 g peso seco de compostos fenólicos.

De acordo com Schienber (2003), os compostos fenólicos quantificados nas cascas de maçã foram as proantocianidinas, os flavonóis, as antocianidinas e ácidos fenólicos (ácido clorogénico).

A análise dos subprodutos da couve-flor revelou a presença de flavonóides e de ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeíco e ácido sinápico). Diferentes combinações de flavonóis com ácido sinápico e glucose foram os principais compostos fenólicos detetados (Lorach *et al.*, 2003a). O estudo dos subprodutos da alface revelou a ocorrência de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides. O perfil de flavonóides dos subprodutos da alface era constituído por flavonas e flavonóis (Lorach *et al.*, 2003b). As peles e as sementes do tomate revelaram também concentrações fenólicas mais elevadas do que a polpa do tomate. No estudo de 12 genótipos de tomate foram verificados níveis de fenólicos inferiores na polpa, entre 9,2 a 27 mg/100 g, comparativamente a 10,4 a 40 mg/100 g nas peles (George *et al.*, 2004). Toor (2005) determinaram em subprodutos do tomate níveis de compostos fenólicos totais, de flavonóides totais, de licopeno, de ácido ascórbico, e de atividade antioxidante superiores, comparativamente com a polpa e as sementes.

De uma forma geral, o teor de compostos fenólicos é ca de 10 vezes maior nas cascas e sementes do que na polpa.

Na Tabela 4 são apresentados diversos estudos no âmbito da extração de compostos bioativos tendo como matrizes diferentes subprodutos da indústria de hortofrutícolas.

Tabela 4. Extração de compostos bioativos de diferentes subprodutos

Subproduto	Composto extraído	Referência
Casca de banana	Óleo essencial	Comin <i>et al.</i> , 2010
Polpa de laranja	Óleo de laranja	Benelli <i>et al.</i> , 2010
Pele de uva	Compostos fenólicos, antioxidantes e antocianinas.	Ghafoor <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de uva	Compostos fenólicos	Pinelo <i>et al.</i> , 2007
Caroço de pêssgo	Óleo do caroço de pêssgo	Natalia <i>et al.</i> , 2010
Pele do tomate	Licopeno	Chun <i>et al.</i> , 2009, Shi <i>et al.</i> , 2009, Lamin <i>et al.</i> , 2008
Sementes de Abóbora	Óleo sementes de abóbora	Mitra <i>et al.</i> , 2009
Batata	Compostos fenólicos	Cavaleiro <i>et al.</i> , 2011
Cascas e sementes de Maçã e Pêra	Compostos fenólicos	Abreu <i>et al.</i> , 2011

(Adaptado de Shilpi *et al.*, 2013, Ahluwalia *et al.*, 2013)

Atendendo ao interesse na recuperação de fitoquímicos naturais a partir de subprodutos de origem vegetal, segue-se uma breve descrição dos principais antioxidantes com bioatividade presentes nos subprodutos, isto é, dos compostos fenólicos e dos carotenóides.

2.2.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um vasto grupo de substâncias de natureza química diversa, abrangendo mais de 8000 compostos distintos, desde formas moleculares simples (ex. ácidos hidroxibenzoicos) a formas complexas de elevado peso molecular (ex. taninos). Em comum apresentam um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo (-OH; Figura 7) e, dependendo dos radicais ligados à sua estrutura química base, os compostos fenólicos podem ser classificados em 3 grandes grupos (Harborne, 1989): os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos, e os respectivos derivados. O grupo dos flavonóides agrupa mais de 3000 estruturas químicas $C_6-C_3-C_6$ ligadas a diferentes radicais (açúcares), podendo este ser ainda dividido em 5 subgrupos (Figura 8): os flavonóis e flavonas, as calconas e auronas, as flavanonas, os isoflavonóides e as antocianinas.

Histologicamente, os compostos fenólicos localizam-se maioritariamente nos vacúolos das células vegetais, sendo a composição específica de cada hortofrutícola quer quantitativamente como qualitativamente. Esta composição é tão distinta entre os HF que pode ser usada como uma impressão digital única, distinguindo ainda os HF ao nível da variedades e da época do ano (Crozier *et al.*, 1997). Os fenólicos são metabolitos essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e participam nos mecanismos de defesa a injúrias externas como lesões com origem física e microbiana.



Figura 7. Estrutura base dos compostos fenólicos – fenol. (<http://www.fotosimagenes.org/imagenes/fenol-6.jpg>)

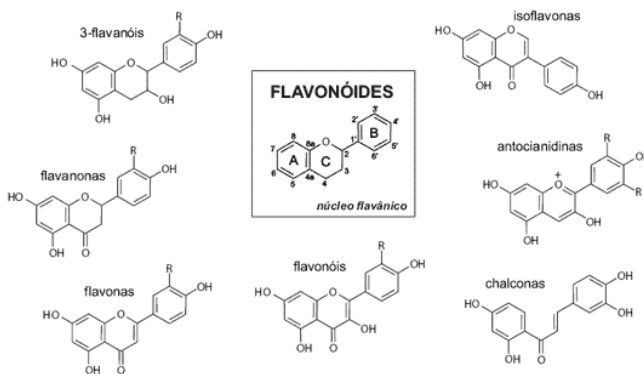


Figura 8. Estruturas gerais dos principais flavonóides (<http://www.ragc.cesga.es/RRAGC/revista2009/quimica.html>)

A composição fenólica presente contribui ainda de forma significativa para a cor, sabor e aroma dos hortofrutícolas e por sua vez dos seus subprodutos associados (Tomás-Barberán e Espín, 2001). Estes compostos apresentam capacidade antioxidante, a par dos carotenóides e do ácido ascórbico (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Atribui-se à ingestão de produtos ricos em compostos fenólicos efeitos biológicos como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogénica, tendo estes efeitos sido demonstrados em diversos estudos, quer clínicos como *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1996).

2.2.2. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos nos HF, com propriedades antioxidantes, sendo o seu quantitativo bastante elevado em produtos como a cenoura, espinafres, tomate, laranja, etc. A principal característica destes compostos é a cor que imprimem aos produtos, nomeadamente as colorações amarela, laranja, vermelha e o violeta, dependendo a respetiva intensidade da cor da concentração de carotenóides presente (Cardoso, 2003).

A maioria dos carotenóides encontrados nos HF apresenta um esqueleto de 40 átomos de carbono (C40), sendo o fitoeno o precursor genérico de toda a vasta gama de carotenóides presentes no reino vegetal. Com base na sua composição, os carotenóides dividem-se em dois grupos (Campos, 2005): carotenos, que são constituídos apenas por átomos de hidrogénio e carbono (ex. α -, β - e γ -caroteno e licopeno); e xantofilas, que derivam dos carotenos por oxidação, (ex., luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, capsantina) (Figura 9). Histologicamente, os carotenóides localizam-se, por norma, em elevadas concentrações em organelos como os cromoplastos (Cardoso, 2003).

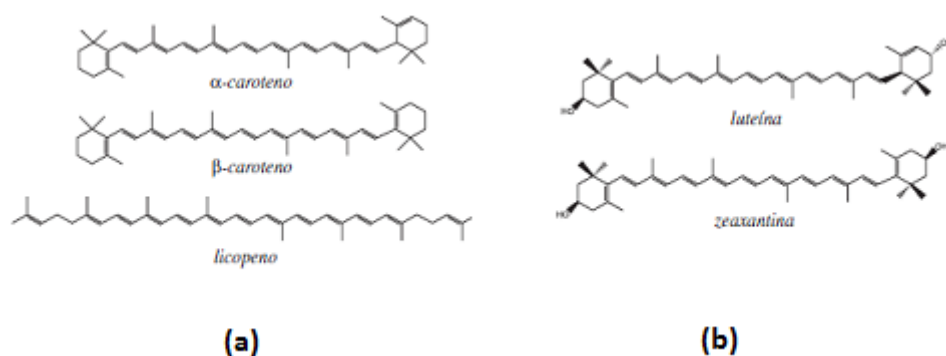


Figura 9. Estruturas representativas de carotenóides: (a) carotenos; (b) xantofilas (http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-2/importancia_nutricional_pigmentos_carotenoides.asp)

Entre os carotenos, destacam-se o α - e o β -caroteno que, para além de capacidade antioxidante, apresentam a propriedade de se converterem em vitamina A sendo por isso denominados de pro-vitamina A (Stahl e Sies, 2005). O β -caroteno apresenta uma eficiência de conversão teórica em vitamina A de 100%, enquanto o α -caroteno apresenta uma taxa de conversão inferior, de 50 a 53% (Desorby *et al.*, 1998; Bushway e Wilson, 1982).

A capacidade de conversão em vitamina A (retinol) que os carotenóides possuem justifica a importância atribuída a estes compostos, que contribuem grandemente para a satisfação dos requisitos diários desta vitamina (Desorby *et al.*, 1998). Das funções acometidas à vitamina A,

destaca-se o seu contributo para a visão, crescimento ósseo, divisão e diferenciação celular (Stahl e Sies, 2005).

São conhecidas outras propriedades biológicas dos carotenóides, destacando-se a atividade anticancerígena (ex. pulmão, pele e próstata) e de prevenção de patologias de foro cardiovascular (Stahl e Sies, 2005; Desorby *et al.*, 1998; Rodriguez-Amaya, 1997).

3. Subprodutos hortofrutícolas como fonte energética

A digestão anaeróbia (DA) é um dos processos possíveis de ser aplicado na valorização energética da matéria orgânica, a partir do qual se obtém um gás combustível, designado por biogás, e um efluente digerido de utilidade agrícola (Lastella *et al.*, 2002; Lata *et al.*, 2002).

A implementação de biogás como fonte de energia renovável apresenta três vantagens: (i) diminui a dependência de combustíveis fósseis, uma vez que é um combustível de alta qualidade e uma alternativa para os combustíveis convencionais (carvão, petróleo e gás natural), (ii) pode ser produzido a partir de quase todos os tipos de matéria-prima orgânica, dando uma resposta para a gestão inadequada de produtos agroindustriais gerados (Holm-Nielsen *et al.*, 2009) e (iii) reduz as emissões de metano (CH₄), um gás com potencial de efeito estufa 25 vezes maior que o dióxido de carbono (CO₂) (Pettus, 2009).

A DA pode assim ser utilizada para valorizar os subprodutos provenientes das indústrias de hortofrutícolas minimamente processados, os quais são constituídos maioritariamente por matéria orgânica, representando uma fonte de energia renovável e versátil e apresentando-se como uma potencial solução de interesse (Bouallagui *et al.*, 2005; De Baere, 2006; Ferreira, *et al.*, 2012).

A digestão anaeróbia é, hoje em dia, bastante competitiva no mercado das energias renováveis (Raposo *et al.*, 2011) e encontra-se em expansão por toda a Europa (Figura 10).

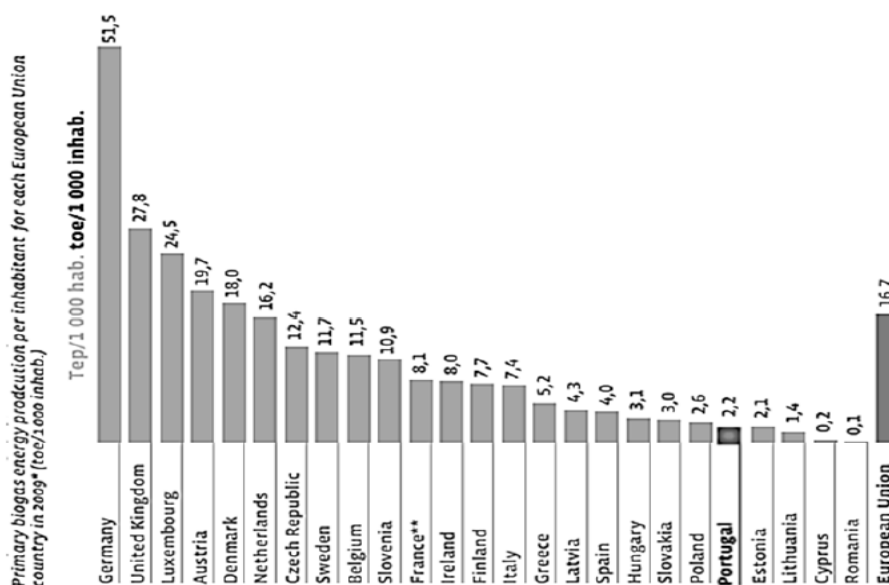


Figura 10. Ranking de produção de Biogás na Europa, em tep/1000 hab, no ano de 2009 (EurObserv'ER, 2010)

A produção média de biogás na Europa atingiu os 16,7 tep/1000 hab em 2009, destacando-se a Alemanha, o maior produtor, com 51,5 tep/1000 hab de energia primária obtida a partir de biogás de produtos/subprodutos agrícolas, como por exemplo do milho, silagem e da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos. Em 2009, Portugal ainda não ultrapassava os 2,2 tep/1000 hab, encontrando-se numa fase de crescimento (EurObserv'ER, 2010).

Ferreira *et al.* (2012) identificou os resíduos sólidos municipais, os efluentes da atividade pecuária e os subprodutos da indústria alimentar como os três principais grupos de efluentes orgânicos valorizáveis pelo processo de digestão anaeróbia em Portugal. O mesmo estudo refere que o potencial em biogás dos sectores da indústria alimentar avaliados ($873 \text{ Mm}^3 \text{ biogas.ano}^{-1}$) corresponde a um potencial elétrico de ca de $2008 \text{ GWh.ano}^{-1}$, o que representa 3,75% dos 53,5 GWh em energia produzidos e importados em Portugal em 2008 (DGEG, 2010).

3.1. Processo de digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia pode ser definida como um processo biológico em que um consórcio microbiano, na ausência de oxigénio, converte os materiais orgânicos (substrato) noutros mais simples e numa mistura gasosa (biogás) (Botheju e Bakke, 2011). Este processo está dependente da atividade e das interações de diferentes populações de microrganismos anaeróbios, obrigatórios e facultativos, de forma a ser assegurada a energia e os nutrientes necessários ao seu crescimento e reprodução (Oliveira, 2005).

A decomposição anaeróbia de compostos orgânicos pode ser descrita como um processo com sete níveis de degradação que se enquadram em quatro fases metabólicas distintas – hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese. Estas são levadas a cabo por três grandes grupos de microrganismos, as bactérias fermentativas e acetogénicas e as *archaea* metanogénicas, Tabela 5.

Tabela 5. Processo de digestão anaeróbia

Grupos de Microrganismos		Fase	Níveis de Degradação
<u>Bacteria</u> Fermentativas		Hidrólise	Hidrólise de proteínas, lípidos e hidratos de carbono
		Acidogénese	Fermentação de aminoácidos e açúcares Oxidação anaeróbia de ácidos gordos de cadeia longa e álcoois
<u>Bacteria</u> Acetogénicas	Produtoras obrigatórias de hidrogénio	Acetogénese	Oxidação anaeróbia de ácidos gordos voláteis
	Utilizadoras de hidrogénio		Conversão de CO_2 e H_2 em ácido acético
<u>Archea</u> Metanogénicas	Acetoclásticas	Metanogénese	Conversão do ácido acético em CH_4
	Hidrogenotróficas		Conversão do H_2 em CH_4

(Ferreira, 2010)

As bactérias fermentativas são responsáveis pelas duas primeiras fases do processo de digestão: a hidrólise e a acidogénese.

Durante a hidrólise as substâncias insolúveis e de elevado peso molecular, como os hidratos de carbono (celulose, hemicelulose e lenhina), proteínas e lípidos, são fragmentadas em matéria orgânica de estrutura mais simples (açúcares, aminoácidos e ácidos gordos de cadeia longa, respetivamente), por exoenzimas excretadas por bactérias hidrolíticas ou anaeróbias facultativas (lipases, celulasas, proteases, peptidases, etc.).

Formam-se assim dois grandes grupos de matéria orgânica: a de baixa e a de elevada biodegradabilidade. Os materiais de mais baixa biodegradabilidade são essencialmente constituídos por moléculas aminadas, lipídicas e pelos polímeros de hidratos de carbono, enquanto que, nos materiais de mais fácil degradação, predominam os aminoácidos, ácidos gordos de cadeia longa e os açúcares. O rendimento da fase da hidrólise é função de fatores como o pH, temperatura, composição e tamanho das partículas do substrato, e das concentrações de produtos intermédios (Hans e Cosima 1994; Veeken *et al.*, 2000).

Na etapa degradativa seguinte, os compostos orgânicos solúveis incluindo os produtos da hidrólise sofrem fermentação e oxidação no interior das células, fase designada por acidogénese. Desta fase resulta a formação de ácidos gordos voláteis (AGV) – acetato, propiónico, butírico, valérico, etc. – e de dióxido de carbono e hidrogénio (Veeken *et al.*, 2000; CCE, 2000).

Os produtos da acidogénese são em seguida convertidos em ácido acético, hidrogénio e dióxido de carbono – fase da acetogénese – pela ação de dois grupos de bactérias acetogénicas: as produtoras obrigatórias de hidrogénio, promotoras da oxidação anaeróbia dos AGV em acetato, e as utilizadoras de hidrogénio, promotoras de acetato a partir de CO₂ e H₂.

A produção de metano, que constitui a última fase do processo, a metanogénese, é levada a cabo por duas categorias principais de microrganismos: as hidrogenólicas, que produzem metano através de CO₂ e H₂, e as acetoclásticas, que usam o acetato (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Para além dos grupos de bactérias até agora referidos, as bactérias sulfato-redutoras podem assumir um lugar de importância relevante no processo de digestão anaeróbia uma vez que competem com as bactérias metanogénicas pelo H₂ e pelo acetato ao utilizar estes produtos para reduzir os sulfatos presentes no meio (CCE, 2000).

Condições de operação

A performance da digestão anaeróbia é influenciada pela combinação de diferentes fatores, tal como as características do substrato (composição, proporção de componentes, tamanho das partículas e biodegradabilidade da matéria). Existem outras variáveis a ter em conta de forma a manter o processo estável, sendo de salientar: a temperatura, pH, relação C/N e teor de sólidos.

Tendo em conta alguns destes parâmetros operacionais, e outros, os sistemas de digestão anaeróbia podem ser caracterizados de acordo com a Figura 11.

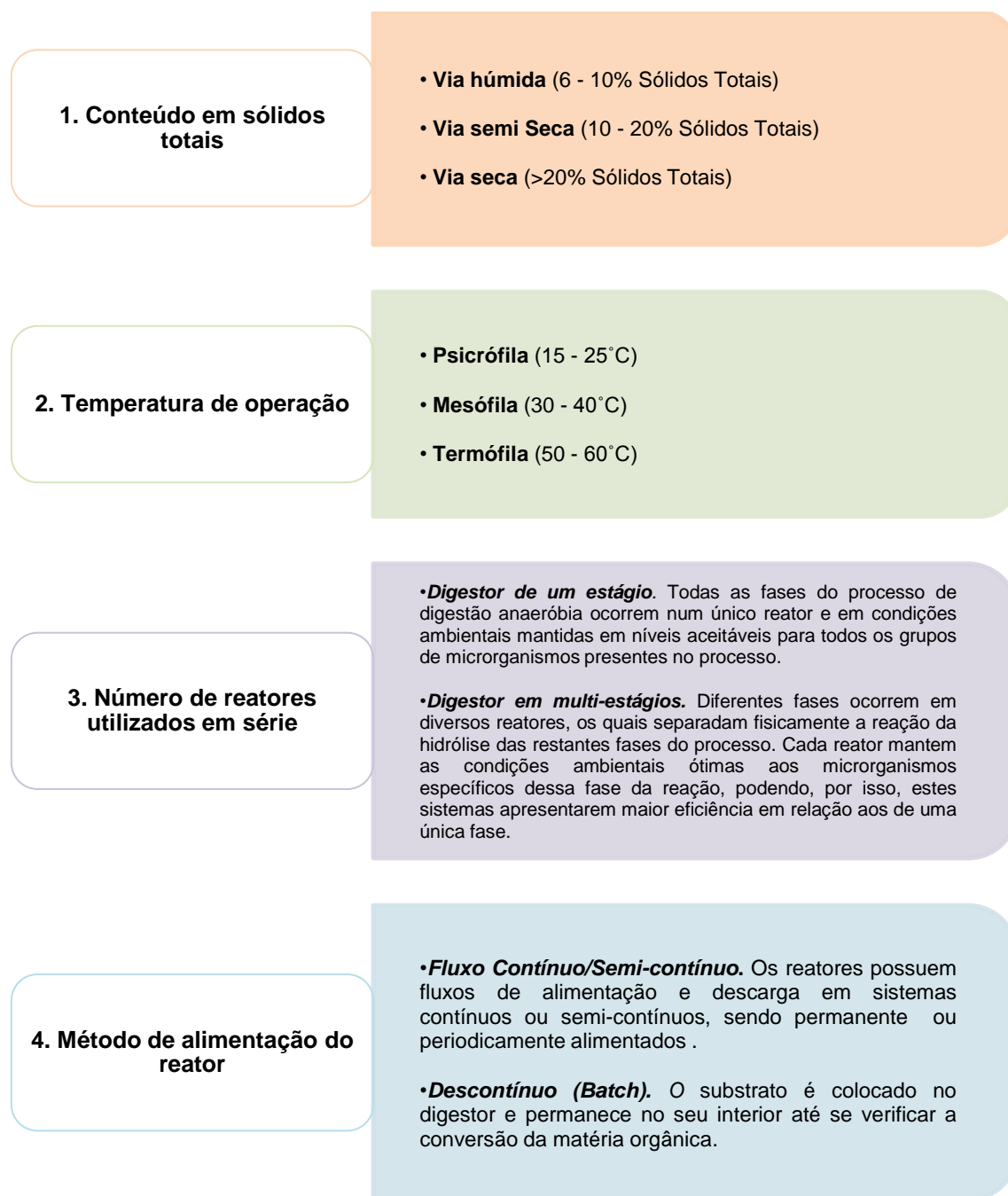


Figura 11. Sistemas de digestão anaeróbia (Adaptado de Ostrem e Tremelis, 2004)

Composição do substrato e proporção de componentes. Para o bom funcionamento de um processo de digestão anaeróbia é essencial que o substrato contenha hidratos de carbono, azoto, fósforo, hidrogénio, oxigénio, água e outros, os quais são considerados componentes essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos envolvidos no processo (Guttler, 2012). Depois do carbono, os componentes necessários de existir em maior concentração são o azoto e o fósforo (Hansen e Cheong, 2007; Pesta, 2007). O carbono é fundamental na

formação de material celular, por sua vez, o azoto na síntese de RNA e DNA e o fósforo na produção de energia de reserva (Parkin e Owen, 1986).

O rendimento em biogás e metano são também eles dependentes da composição do substrato, particularmente de proteína, lípidos e hidratos de carbono, Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento em biogás dos principais componentes

Componente	Biogás (L.SV _{removidos} ⁻¹)
Hidratos de carbono	0,83
Lípidos	1,45
Proteínas	0,99

(Adaptado de Guttler, 2012)

Também a elevada composição em água favorece o processo uma vez que dissolve a matéria orgânica de rápida degradação (Hernandez-Berriel *et al.*, 2008). Foi identificado que os maiores rendimentos na produção de metano ocorreram na digestão de materiais com 60-80% de humidade (Bouallagui *et al.*, 2003).

Biodegradabilidade. Os materiais totalmente degradáveis biologicamente são os mais adequados para serem utilizados como substratos no processo de digestão anaeróbia. As frações de compostos orgânicos complexos podem apresentar velocidades de degradação muito distintas. A taxa de degradação da celulose, por exemplo, pode demorar semanas, a da hemicelulose e proteínas alguns dias, enquanto que, a degradação de pequenas moléculas como açúcares, ácidos orgânicos voláteis e álcoois ocorre em horas (Coombs, 1990). Compostos presentes em resíduos vegetais, como a lenhina, consideram-se como não suscetíveis de degradação pela maioria dos sistemas de digestão anaeróbia pelo facto de necessitarem de tempo de retenção muito elevados, na ordem dos 250 dias (Benner, 1984).

Temperatura. O controlo da temperatura é crucial para o bom funcionamento do processo, uma vez que este parâmetro influencia a atividade biológica dos microrganismos e, consequentemente, a velocidade a que ocorre o processo de digestão e de biodegradação dos compostos. Dada a grande diversidade de estirpes microbianas, existem diversas gamas de temperatura ótimas sendo que, para os processos anaeróbios são normalmente consideradas três gamas: psicrófila, mesófila e termófila (Figura 11) (Garardi, 2003). Os processos de digestão anaeróbia ocorrem maioritariamente em ambientes mesófilos, uma vez que a operação é mais estável e requer uma menor quantidade de energia despendida no processo (El-Mashad *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2008). As metanogénicas apresentam um crescimento máximo na gama mesófila, para temperaturas entre 30 e 38°C.

pH. Um dos parâmetros mais importantes para o metabolismo dos microrganismos é o pH. Liu *et al.* (2008) verificou que a gama ótima de pH para a obtenção máxima de biogás num processo de DA é de 6,5 - 7,5, sendo contudo o valor ótimo variável de acordo com o tipo de substrato e as características do processo.

A atividade dos grupos de microrganismos intervenientes no processo, quando considerados isoladamente, apresentam sensibilidades diferentes ao pH. Contudo, em tecnologias onde o processo é realizado num único reator a digestão anaeróbia dá-se numa gama ótima de pH entre 6,8 e 7,2. No caso de reatores em duas fases, na fase de hidrólise e fermentação o pH ótimo ronda o intervalo entre 5 e 6,5 e na fase acetogénica e metanogénica 6,8 e 7,4 (Berardino, 2000).

Relação C/N. Uma relação equilibrada entre carbono e azoto (C/N) na matéria orgânica é fundamental para o bom sucesso do processo de digestão. É globalmente aceite que esta relação é tida como ótima para valores entre 20 e 30, com base no carbono biodegradável.

Um substrato com uma relação C/N elevada, não é adequado para o crescimento microbiano devido à deficiência de azoto. Como resultado, a taxa de produção de gás e de degradação dos sólidos será baixa. Por outro lado, se a relação C/N for muito baixa, isto é, se o substrato apresentar elevado teor em azoto, o processo de degradação leva à acumulação de amoníaco que apresenta níveis de toxicidade para os microrganismos anaeróbios. De entre os grupos de microrganismos existentes no processo de digestão anaeróbia, é aceite que as metanogénicas são as mais sensíveis a valores elevados de amoníaco (Gerardi, 2003; Deublein e Steinhauser, 2008).

Teor de Sólidos. O teor de sólidos é considerado um dos parâmetros fundamentais na escolha de um digestor. Existem três gamas de concentrações dominantes para a DA: a via húmida, a semi-seca e a seca (Figura 11). Para tecnologias por via húmida, os fatores de diluição extremos exercem importantes problemas operatórios dado que suspensões muito diluídas promovem o assentamento de partículas sólidas no fundo do digestor, na inexistência de agitação no interior do reator. Por outro lado, acima de 10% ST, a eficiência de transferência de massa líquido/gás é comprometida nas zonas mais baixas do reator (Carlsson *et al.*, 2012). Mas, ao contrário dos métodos de tratamento por via seca, em sistemas por via húmida podem ser atingidas maiores taxas de metanogénese devido ao elevado fluxo de transferência de ácidos produzidos durante a acidogénese e acetogénese conduzindo simultaneamente a elevadas eficiências de remoção de sólidos e altas produções específicas de metano (Nagao *et al.*, 2012).

Inibição do processo

A inibição de uma ou mais que uma fase do processo de digestão pode ocorrer devido a componentes e substâncias tóxicas presentes no substrato, bem como a produtos intermédios e finais do processo. A diminuição do pH, a baixa produção de biogás, o baixo teor em metano e a baixa eficiência de remoção de CQO são indicadores usuais de inibição. Particularmente a inibição da metanogénese a qual é usualmente indicada por uma baixa produção de biogás e elevada concentração de AGV (Hansen e Cheong, 2007).

3.2. Subprodutos hortofrutícolas como substrato à digestão anaeróbia

Os subprodutos hortofrutícolas apresentam tipicamente uma fração orgânica constituída por ca de 75% de açúcares e hemicelulose, 9% de celulose e 5% de lenhina (Raynal *et al.*, 1998 e Verrier *et al.*, 1987). Buffiere *et al.* (2006) determinou a relação entre o teor em lenhina e celulose e a biodegradabilidade do substrato tendo constatado que quanto menor os teores nestes compostos maior a biodegradabilidade do substrato (Figura 12).

Os SHF apresentam assim uma elevada biodegradabilidade, elevada percentagem de humidade e um elevado conteúdo orgânico (> 95% de SV do total de sólidos), pelo que se pressupõe que apresentem condições favoráveis para serem valorizados por digestão anaeróbia (Appels *et al.* 2011; Arvanitoyannis e Varzakas, 2000).

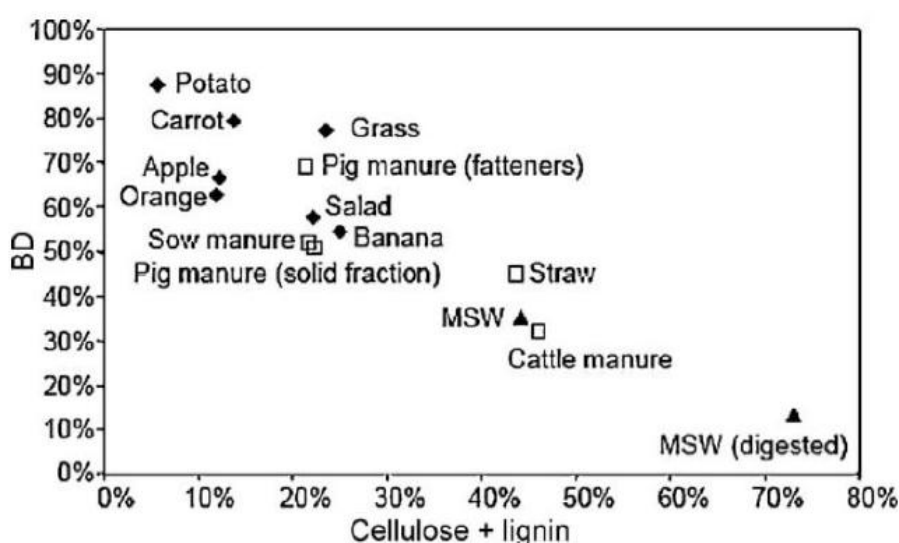


Figura 12. Relação entre o teor em lenhina e celulose e a biodegradabilidade (%), da matéria orgânica (Buffiere *et al.*, 2006)

Gunaseelan (1997) elaborou uma revisão nos processos de digestão anaeróbia de diferentes tipos de subprodutos hortofrutícolas e concluiu que o respetivo rendimento em metano era muito maior do que o obtido comparativamente com outro tipo de materiais biodegradáveis, entre os quais resíduos sólidos municipais.

Contudo, diversos estudos indicaram problemas e limitações na estabilidade e na manutenção do processo aquando da digestão deste tipo de material. Knol (1978) estudou o processo de

digestão em contínuo em condições mesofílicas para uma mistura de SHF (espinafres, espargos, feijão, morangos, maçã, cenoura e pera) resultante de uma indústria de enlatados/conservas, e verificou que diversos destes materiais causaram instabilidade no processo. Foram necessárias medidas interventivas tais como a adição de um meio alcalino, paragem da alimentação e a adição de uma mistura suplementar rica em azoto. Também Lane (1979) reportou experiências com subprodutos hortofrutícolas (abacate, milho, maçã, espargos, cana de açúcar e ananás) nas quais verificou problemas de diminuição do pH e diminuição do rendimento em biogás.

Diversos estudos documentam que a hidrólise é a fase limitante do processo de digestão de materiais complexos em compostos solúveis para substratos com um elevado teor de sólidos (Chulhwan *et al.*, 2005; Mumme *et al.*, 2010). No caso dos subprodutos hortofrutícolas, com baixo teor de celulose, a metanogénese apresenta-se como a fase limitante (Garcia-Pena *et al.*, 2011). Este facto é explicado pela tendência que estes materiais têm para acidificar.

A acidificação deste tipo de produtos origina consequentemente a diminuição do pH no reator o que, por sua vez, vai inibir a atividade microbiana do processo. Esta inibição vai favorecer uma maior produção de AGV de comprimento de cadeia de carbonos maior, o que não favorece a atividade dos organismos metanogénicos (Gerardi, 2003). Estes ácidos ao penetrar a membrana celular induzem a diminuição do pH interno, provocando um decréscimo da velocidade metabólica ou a morte celular (Deublein e Steinhauser, 2008). Estas ocorrências levam a que a atividade das metanogénicas seja diminuída e, por sua vez, a quantidade de biogás produzida seja menor (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Além disso, os subprodutos hortofrutícolas definem-se por um baixo teor de azoto e de fósforo o que pode comprometer o desenvolvimento e manutenção do processo em condições de estabilidade (Callaghan *et al.*, 2002).

3.2.1. Pré-tratamentos

Uma das soluções possíveis para otimizar a aplicação dos subprodutos hortofrutícolas a um processo de digestão é a aplicação de pré-tratamentos, com o intuito de remover potenciais inibidores e outros agentes desestabilizadores do processo, ou de hidrolisar partículas de grande dimensão. Estes pré-tratamentos irão aumentar as condições de solubilização do substrato, melhorar as condições de biodegradação e contribuir para que a produção específica de biogás seja otimizada (Carlsson *et al.*, 2012).

Conerti (1999) aplicou um pré-tratamento com altas temperaturas à matéria orgânica de uma mistura de hortofrutícolas de forma a aumentar a eficiência do seu processo de digestão, enquanto Srilatha (1995) pré-tratou subprodutos obtidos do processamento de laranja através de um processo de fermentação com *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicillium*, com o intuito de promover a produção de biogás e o rendimento em metano por matéria orgânica degradada.

Apesar dos benefícios proporcionados pelos pré-tratamentos alguns deles têm associados custos operacionais elevados que podem tornar o processo inviável.

3.2.2. Complementaridade de substratos

O trabalho desenvolvido no âmbito da DA dos efluentes dos lagares de azeite (vulgarmente designada por água-ruça) mostrou ser possível superar as características desfavoráveis deste tipo de substrato quanto à sua valorização por anaerobiose através da “complementaridade de efluentes” (Sampaio *et al.*, 2011). Destacam-se, para o efeito, a elevada concentração orgânica, a toxicidade devida à carga lipídica e fenólica, o pH ácido, a baixa alcalinidade e a deficiência em azoto.

O conceito da “complementaridade de efluentes” é desenvolvido de forma a suprimir as fases operacionais relacionadas com alguns pré-tratamentos e correções do substrato. Foi, assim, demonstrado ser possível utilizar o efluente em estudo sem qualquer alteração prévia, tendo por base a seleção de um efluente adicional que o pudesse neutralizar e complementar (Marques *et al.*, 1997; 1998). Neste contexto, dois tipos de digestores anaeróbios de leito fixo foram concebidos, postos em marcha e operados em modo contínuo, tendo sido possível fornecer as condições de pH requeridas, diminuir a concentração de compostos tóxicos e/ou desfavoráveis e incrementar os níveis de nutrientes na massa em digestão (Marques, 2001; Gonçalves *et al.* 2012).

Através da complementaridade de efluentes é possível tornar o processo de tratamento/valorização de um efluente desequilibrado e tóxico, mais simples, flexível e barato. As principais vantagens deste tipo de abordagem na digestão anaeróbica refletem-se: (1) na melhoria da produção do rendimento em metano, devido ao fornecimento de uma mistura de nutrientes suplementares a partir dos substratos complementares; (2) na utilização mais eficiente do equipamento e (3) nos custos partilhados por processamento múltiplo de diferentes fluxos de subprodutos numa única instalação (Alatríste-Mondragon *et al.*, 2006). Desta forma a aplicação da estratégia da “complementaridade de substratos” reveste-se do maior interesse dado os inerentes benefícios (tecnológicos, económicos e ecológicos) a ela associada.

No que se refere aos SHF, a utilização de outros subprodutos, especificamente subprodutos com um maior teor em azoto, é favorável por evitar a acidificação deste tipo de materiais (Garcia-Pena *et al.*, 2011) e equilibrar a relação C/N (Bouallagui *et al.*, 2009). Consequentemente maiores quantidades de subprodutos hortofrutícolas podem ser tratadas utilizando a mesma unidade de digestão.

A título de exemplo, Bouallagui (2009) avaliou o efeito da adição de resíduos de peixe, de lamas ativadas e de águas residuais de um matadouro no processo de digestão de SHF. O estudo teve como objetivo equilibrar a relação C/N na mistura, além da respetiva incorporação atribuir poder tampão à massa em digestão dentro do reator, reduzindo assim as limitações de utilização dos subprodutos hortofrutícolas como substratos.

3.3. Biogás

O biogás é um gás produzido no decorrer da DA, aquando da decomposição da matéria orgânica, na ausência de oxigénio por microrganismos metabolicamente ativos. É essencialmente constituído por compostos onde o carbono se encontra no seu estado máximo de redução e de oxidação, isto é na forma de metano (CH_4) e de dióxido de carbono (CO_2) (Botheju e Bakke, 2011). De acordo com a Tabela 7, os restantes gases aparecem em concentrações bastante mais reduzidas.

Tabela 7. Composição do biogás

Gás	Símbolo	Biogás (%)
Metano	CH_4	50-75
Dióxido de Carbono	CO_2	25-45
Vapor de Água	H_2O	1-2
Sulfídrico	H_2S	0,1-0,5
Monóxido de Carbono	CO	0-0,3
Nitrogénio	N_2	1-5
Hidrogénio	H_2	0,3
Oxigénio	O_2	Vestígios

(AEBIOM, 2009)

O interesse do biogás como recurso energético deve-se ao seu principal constituinte: o metano. Este gás puro, em condições normais (PTN) de pressão (1 atm) e temperatura (0°C), tem um poder calorífico inferior (PCI) de $9,9 \text{ kWh/m}^3$ (CCE, 2000). O biogás com um teor de metano de 65% possui um poder calorífico de $6,5 \text{ kWh/m}^3$ (Figura 13).

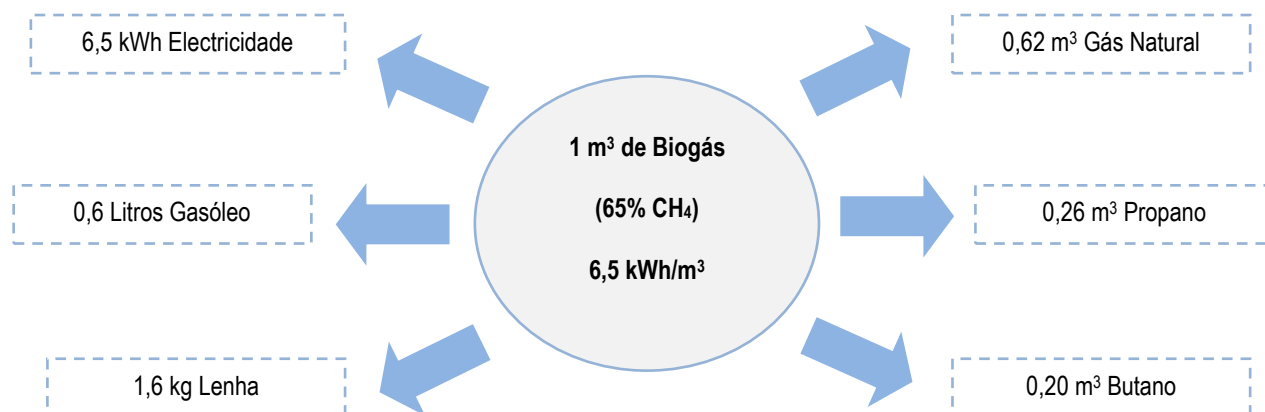


Figura 13. Equivalência energética bruta do biogás com 65% de metano, apenas com base no PCI e sem entrar em conta com eficiências de conversão (Adaptado de CCE, 2000)

O biogás pode ser transformado em energia elétrica e energia térmica, separadamente ou em conjunto num processo designado por cogeração (Novais e Marques, 2002). Pode também ser convertido simultaneamente em energia elétrica, calor e frio (trigeração). Da purificação do biogás obtém-se o biometano, que pode ser ainda injetado nas condutas de gás natural, e ser utilizado como combustível para transporte. Seja qual for a opção adotada existirá sempre a produção de, pelo menos, uma das seguintes formas de energia: elétrica, térmica ou mecânica (Figura 14). Assim, o biogás produzido a partir de subprodutos pode integrar o sistema energético da própria indústria geradora, neste caso a indústria de hortofrutícolas minimamente processados.

Uma das vantagens da produção de biogás sobre outro tipo de energias renováveis existentes no mercado relaciona-se com o facto de conter um PCI compatível com o do gás natural, podendo ser produzido a um menor custo através de matéria biodegradável considerada como subproduto industrial (Abbasi *et al.*, 2012).

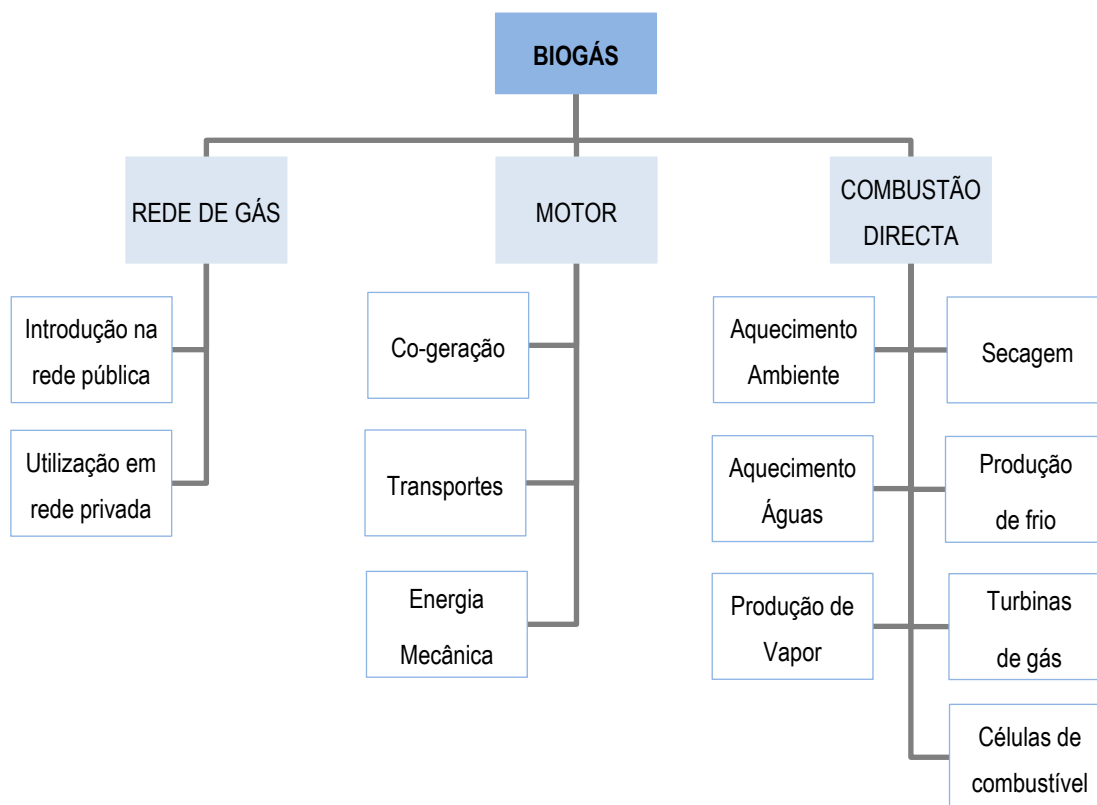


Figura 14. Principais tipos de utilizações do biogás (Adaptado de Ferreira, 2010)

II - TRABALHO EXPERIMENTAL

4. MÉTODOS

4.1. Métodos Analíticos

4.1.1. pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com dois métodos, consoante o material em análise.

O valor de pH (à temperatura ambiente) foi obtido no homogeneizado da amostra em água destilada (1:1, p:p) utilizando um medidor de pH Crison Micro pH 2001 (*Crison Instruments*, Espanha), na parte experimental I. Os valores médios resultaram da média de 3 determinações por amostra.

Na parte experimental II o pH foi determinado diretamente nas amostras, sem qualquer tipo de diluição, numa única determinação, utilizando um medidor de pH InolaB pH 720.

4.1.2. Teor de Sólidos Solúveis

O teor de sólidos solúveis totais (TSS) foi medido no homogeneizado da amostra em água destilada (1:1, w:v), utilizando um refratômetro digital (DR-A1, ATAGO Co Ltd., Japão). Os resultados são expressos em °Brix, representando a percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto, resultantes de 3 determinações por amostra.

4.1.3. Cor CIELab

Os parâmetros da cor foram determinados com o auxílio do colorímetro Minolta CR 300 (Osaka, Japan), no sistema *CIELab* (iluminante C), sendo a calibração efetuada a partir do padrão de referência branco ($L^* = 97,10$; $a^* = 0,19$; $b^* = 1,95$). Os valores médios foram obtidos de 27 determinações por amostra.

Por leitura direta no aparelho obtiveram-se os parâmetros L^* , a^* e b^* . O parâmetro L^* representa a luminosidade da amostra, traduzindo a variação da tonalidade entre escuro e claro, sendo o seu intervalo de variação compreendido entre 0 (preto) e 100 (branco). No que respeita aos parâmetros a^* e b^* , estas coordenadas traduzem variações de cor entre vermelho (+60) e verde (-60) para o parâmetro a^* e entre amarelo (+60) e azul (-60) para o parâmetro b^* . A aproximação destas coordenadas ao valor nulo traduz cores neutras como o branco, o cinzento e o preto.

A partir dos parâmetros *CIELab*, foram calculados os parâmetros de tonalidade (h° ; Hue) e o índice de escurecimento (*Whitness Index*, WI).

O atributo de cor h° (Eq. 1 a 3) pode ser definido como o ângulo (0-360°) que transmite a tonalidade de cor. Os ângulos formados variam pelos eixos dos parâmetros a^* e b^* , definindo assim a tonalidade da cor. Ângulos entre 0° e 90° correspondem aos vermelhos, laranjas e

amarelos; de 90° a 180° os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180° a 270° os verdes, cianos e azuis; de 270° a 360° os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Dafne, sd). Este atributo é calculado através das seguintes expressões matemáticas:

$$h^{\circ} = \frac{\left(\arctg \frac{b^{*}}{a^{*}} \right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^{*} > 0 \text{ e } b^{*} > 0 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$h^{\circ} = 180 + \frac{\left(\arctg \frac{b^{*}}{a^{*}} \right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^{*} < 0 \quad (\text{Eq.2})$$

$$h^{\circ} = 360 + \frac{\left(\arctg \frac{b^{*}}{a^{*}} \right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^{*} > 0 \text{ e } b^{*} < 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

Segundo Bolin e Huxsoll (1991), o índice de escurecimento é o parâmetro que melhor correlaciona o aparecimento de material branco à superfície da amostra, ou seja, traduz a maior ou menor presença de branco de acordo com a escala apresentada na Tabela 8, sendo calculado pela resolução da seguinte expressão:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^{*})^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Tabela 8. Classificação do nível de escurecimento (WI) da amostra

WI (%)	Nível de escurecimento
0	Não branco
3,3 – 8,3	Ligeiramente branco
8,3 – 25	Moderadamente branco
25 – 50	Distintamente branco
50 – 100	Extremamente branco

Fonte: Bolin e Huxsoll (1991)

4.1.4. Teor de Humidade

A humidade foi determinada segundo o método descrito na NP - 784 (1970). Os resultados médios, expressos em % (m/m), foram obtidos a partir da média de 3 determinações por amostra.

4.1.5. Conteúdo Fenólico Total

A técnica utilizada para a determinação do Conteúdo Fenólico Total (CFT) teve por base o método descrito por Swain e Hillis (1959). As amostras (5 g) foram homogeneizadas em metanol (20 mL) utilizando um polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha) tendo sido posteriormente incubadas *overnight* a 4 °C. Os homogenatos foram centrifugados a 29000 g durante 15 min a 4° C (RC5C Sorvall Instruments, rotor nº SS-34) e o sobrenadante límpido (extrato metanólico) foi posteriormente utilizado para a determinação do CFT. Os extratos metanólicos (150 µL) foram diluídos em água nanopura (2400 µL), aos quais se adicionou em seguida o reagente de Folin-Ciocalteu a 0,25 N (150 µL). A mistura foi incubada durante 3 min e em seguida foi adicionado Na₂CO₃ a 1 N (300 µL). A mistura final foi incubada durante 2 h no escuro à temperatura ambiente. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 725 nm num espectrofotómetro ATI Unicam UV/VIS 4 (Unicam Sistemas Analíticos, Lisboa, Portugal). O CFT é expresso em mg de equivalentes de ácido clorogénico.100 g⁻¹ de tecido (mg EAC. 100 g⁻¹).

4.1.6. Conteúdo em Carotenóides Totais

A determinação do Conteúdo em Carotenóides Totais (CCT) teve por base o método descrito por Talcott (2001). As amostras (2 g) foram homogeneizadas numa solução de acetona:etanol (20 mL) contendo 200 mg/L de BHT (condições semiescuras), utilizando um polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha) até se obter uma consistência uniforme. O homogenato foi filtrado através de um filtro Whatman #4 e lavado com solução de acetona:etanol até que nenhuma alteração de cor adicional fosse observada. Perfez-se a um volume final de 100 mL com a referida solução e transferiu-se para um erlanmayer em vidro âmbar, ao qual foi adicionado n-hexano (50 mL). A mistura foi agitada vigorosamente e deixada repousar durante 20-30 minutos, após os quais se adicionou água nanopura (25 mL) de forma a promover a separação de fases. A solução de carotenóides (fase orgânica) foi submetida a leituras numa cuvette de vidro a 470 nm utilizando um espectrofotómetro ATI Unicam UV/VIS 4 (Unicam Sistemas Analíticos, Lisboa, Portugal). O CCT é expresso em mg β-caroteno.100 g⁻¹ de tecido (mg β-caroteno. 100 g⁻¹).

4.1.7. Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante (AOx) foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Arnao *et al.* (2001) com algumas modificações, utilizando ABTS.

Extratos Hidrofílicos

O extrato hidrofílico foi obtido através da homogeneização da amostra (5 g) em metanol (20 mL) utilizando um polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha) e incubado *overnight* a 4°C. Após a obtenção do extrato límpido por centrifugação a 29000 g durante 15 min a 4°C (RC5C Sorvall Instruments, rotor SS-34), fez-se reagir 150 µL do

mesmo com 2850 µL do reagente ABTS, durante 2h no escuro à temperatura ambiente. A absorvância dos extratos foi medida espectrofotometricamente a 734 nm (espectrofotômetro ATI UNICAM UV/VIS 4, Unicam Sistemas Analíticos, Lda., Portugal). Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox por 100 g de produto ($\mu\text{g ET.100 g}^{-1}$), resultantes da média de $n \geq 3$ determinações por amostra.

Extratos Lipofílicos

O extrato lipofílico foi obtido através da homogeneização da amostra (2 g) em diclorometano (10 mL), utilizando um polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha) e da filtração com um filtro Whatman #4. O extrato foi recolhido e fez-se reagir 150 µL da mesma com 2850 µL do reagente ABTS, durante 2h no escuro, à temperatura ambiente. A absorvância dos extratos foi medida espectrofotometricamente a 734 nm (espectrofotômetro ATI UNICAM UV/VIS 4, Unicam Sistemas Analíticos, Lda., Portugal). Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (15 µM a 1000 µM) por 100 g de produto ($\mu\text{g ET.100 g}^{-1}$), resultantes da média de $n \geq 3$ determinações por amostra.

Preparação do reagente ABTS

O reagente ABTS foi produzido no escuro por um período mínimo de 12 h à temperatura ambiente, pela reação equitativa de ABTS (15 mM) com persulfato de potássio (4,9 mM). O reagente foi posteriormente diluído com etanol (1:60, v:v) para a absorvância apropriada (1,100 \pm 0,020 unidades de absorvância a 734 nm) previamente à sua utilização. A redução da absorvância foi medida espectrofotometricamente a 734 nm (espectrofotômetro ATI UNICAM UV/VIS 4, Unicam Sistemas Analíticos, Lda., Portugal).

4.1.8. Carência Química de Oxigénio

O Método 5520 - *Standard Methods* modificado (APHA *et al.*, 1999) foi utilizado para a determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO). Uma toma da amostra (0,5 mL) foi diluída com água nanopura perfazendo um volume total de 20 mL, à qual foi adicionado sulfato de mercúrio (0,5 g), solução de sulfato de prata em H_2SO_4 (30 mL) e dicromato de potássio a 0,25 N (10 mL). A preparação foi colocada no digestor (Bloc Digest 20, P-Selecta) a 150°C durante 2 h. Posteriormente, após arrefecida a amostra, juntaram-se algumas gotas da solução de ferroína e fez-se a redução do excesso de dicromato por titulação com solução de sulfato de ferro e amónio a 0,25 N. Os resultados de CQO são expressos em $\text{g O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ de amostra.

4.1.9. Azoto Total

O azoto total foi determinado pelo método de Kjeldhal modificado com base no Método 4500- N_{org} B, Macro-Kjeldahl Method - *Standard Methods* (APHA *et al.*, 1999). A determinação do azoto total tem 3 fases no seu procedimento: digestão, destilação e titulação. Na primeira fase foi adicionado à amostra (5 mL) o reagente de digestão (50 mL) no tubo de digestão, o qual foi

posteriormente colocado no digestor (Buchi Digestion Unit K-424). A digestão terminou quando a solução se tornou transparente. Atingido o ponto referido adicionou-se 100 mL de água nanopura e o indicador fenolftaleína. Posteriormente, o tubo foi acoplado ao aparelho de destilação (Buchi Distillation Unit K-350) e foi adicionado hidróxido de sódio-tiosulfato de sódio (150 mL). No decorrer do processo de destilação o destilado foi recolhido para um erlenmeyer com ácido bórico (50 mL) e em seguida titulado com uma solução de ácido sulfúrico 0,02 N. O azoto total é expresso em g de N orgânico.L⁻¹ de amostra.

4.1.10. Azoto Amoniacal

Para a determinação do azoto amoniacal seguiu-se o procedimento descrito no Método 4500-NH₃. - *Standard Methods* (APHA *et al.*, 1999). A fase da destilação iniciou-se com uma toma de 10 mL de amostra perfeita com água nanopura a um volume final de 150 mL, seguindo-se a adição do tampão borato (25 mL) e o ajuste do pH a 9,5 com NaOH 6 N. O destilado obtido foi recolhido para um erlenmeyer com ácido bórico (50 mL) e finda a primeira fase este foi titulado com ácido sulfúrico 0,02 N. Os resultados são expressos em g de N amoniacal.L⁻¹ de amostra.

4.1.11. Sólidos Totais/Sólidos Voláteis

Os Sólidos Totais (ST) e os Sólidos Voláteis (SV) foram determinados de acordo com o Método 2540 - *Standard Methods* (APHA *et al.*, 1999). De acordo com o referido método o volume de amostra (5 mL) foi colocado num cadinho tarado e colocado a 105°C durante 24 h, seguido de 30 minutos na mufla a 550°C. Os ST e os SV são apresentados em g.L⁻¹ de amostra.

4.1.12. Sólidos Suspensos Totais/Sólidos Suspensos Voláteis

A técnica para a determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST) e dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foi efetuada seguindo o Método 2540 - *Standard Methods* (APHA *et al.*, 1999). Após tarar o cadinho e o filtro GFC 1,2 µm vazio, foi filtrado um volume de amostra em vácuo, tendo sido colocado em seguida na estufa a 105°C durante 24 h e posteriormente na mufla a 550°C (30 minutos). Os resultados são expressos g.L⁻¹ de amostra.

4.1.13. Ácidos Gordos Voláteis

Para a determinação dos ácidos gordos voláteis das amostras foram considerados os ácidos: acético (C2), propiónico (C3), isobutírico (IC4), butírico (C4), isovalérico (IC5) e valérico (C5). No decorrer da atividade laboratorial são discutidos dois métodos de determinação dos ácidos gordos voláteis (AGV) devido a uma avaria do equipamento.

Método 1. Foi utilizado um cromatógrafo Hewlett Packard 5890, com detetor de ionização de chama (FID) e coluna de enchimento (4% Carbowax, 20M, 1% trimesil acid 80-120 Carbopack BDA). A amostra foi inicialmente centrifugada (150000 rpm) durante 2 minutos. Posteriormente

retirou-se cerca de 1 mL do sobrenadante das amostras centrifugadas e filtrou-se utilizando filtros de celulose de 0,45 μm de poro. As amostras foram congeladas até ao momento da análise. Aquando da análise, as amostras foram descongeladas e a 250 μL de amostra foram adicionados 250 μL de padrão interno (ácido pivalico) tendo-se injectado 1 μL da mistura no cromatógrafo. O aparelho foi calibrado utilizando uma mistura padrão de AGV (SupelcoTM WSF-2 Mix 1 g.L^{-1}).

Método 2. As determinações foram realizadas num HPLC Agilent série 1100 equipado com injetor automático, detetor de índice de refração (L7490) e coluna Aminex HPX87H. As análises decorreram a 50°C e as amostras foram eluídas com uma solução de H_2SO_4 5 mM, a um fluxo de 0,5 mL/min.

As amostras foram previamente centrifugadas e filtradas (tal como indicado no Método 1) e calibrou-se com a mesma mistura padrão de AGV.

4.1.14. Caracterização da composição do biogás

A análise da composição do biogás obtido no decorrer do ensaio foi realizada num cromatógrafo Varian 430-GC com detetor TCD, tendo como gás de arraste o hélio. As temperaturas do injetor, forno e detetor foram de 80°C, 50°C e 120°C, respetivamente. De forma a determinar corretamente a composição do biogás obtido foi necessário comparar os resultados experimentais com os obtidos em padrões de composições conhecidas, referidas na Tabela 9, analisando tomas de 0,5 mL. Foi utilizado o padrão mais indicado com base nos resultados expectáveis.

Tabela 9. Padrões de composição conhecida na avaliação da composição do biogás

ID Padrão	CH_4 #1 (%)	CO_2 (%)	O_2 (%)	N_2 (%)	CH_4 #2 (%)
P1	70,01	19,98	8,00	2,01	70,01
P2	40,00	40,00	2,01	17,99	40,00
P3	55,06	29,90	5,01	10,03	55,06

4.2. Métodos Estatísticos

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com recurso ao Software StatisticaTM v.8.0 da Statsoft (2007), por análise de variância (ANOVA), sendo utilizado o teste Tukey ($p < 0,05$) para separação de médias.

5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Da necessidade de encontrar soluções adequadas para gerir a quantidade elevada de material vegetal descartado - subprodutos, das linhas de processamento mínimo, foram estudadas duas vias conducentes à respetiva valorização:

- A. Identificação e caracterização do potencial bioativo dos subprodutos, com o intuito de considera-los fontes potenciais para a recuperação de compostos fitoquímicos de interesse;
- B. Testar o potencial destes subprodutos enquanto substratos para a produção de biogás através de processos de digestão anaeróbia.

5.1. Identificação e Caracterização do Potencial Bioativo dos Subprodutos

5.1.1. Objetivos

A empresa de processamento de hortofrutícolas minimamente processados em análise labora uma multiplicidade de hortofrutícolas cujos volumes envolvidos são variáveis ao longo do ano, em função da respetiva sazonalidade. Por questões de operacionalidade fabril existem limitações na coleta em separado dos desperdícios, por matéria-prima, sendo em consequência inviável o tratamento dos diferentes subprodutos *per si*. Neste sentido foi necessário, numa primeira fase, quantificar os volumes de subprodutos gerados e agrupa-los em classes por tipo de desperdícios gerados, de acordo com a respetiva representatividade (quantidades médias produzidas) e / ou homogeneidade de composição. Numa fase posterior, efetuou-se a caracterização propriamente dita do potencial bioativo das diferentes classes estabelecidas.

Objetivo 1 Quantificar os volumes de subprodutos gerados e agrupa-los em classes tipo, segundo um critério de homogeneidade da composição veiculada e de quantitativos produzidos.

Objetivo 2 Caracterizar as classes de subprodutos do ponto de vista físico-químico e sensorial.

5.1.2. Metodologias para a identificação das classes de subprodutos

Esta análise envolveu o levantamento dos volumes e tipos de subprodutos produzidos através de uma avaliação documental de registos mensais de produção da empresa. Para tal consideraram-se os volumes diários laborados, por matéria-prima, relativos ao mês de dezembro, por ser este considerado um período representativo em termos de volume e heterogeneidade de produção (dezembro de 2012). A estimativa do cálculo do volume de desperdícios gerados teve ainda em conta as percentagens médias de desperdício associadas

a cada matéria-prima – percentagens calculadas pela empresa face à experiência real de laboração.

5.1.2.1. Resultados e discussão

A empresa produz uma diversidade alargada de produtos para venda a retalho, entre os quais se contam, uma diversidade de produtos prontos a consumir: misturas de hortícolas para saladas e hortofrutícolas preparados isoladamente; produtos prontos a cozinhar, como as misturas de hortícolas para sopas ou outras preparações culinárias. O modo de apresentação do produto é variável de acordo com as características pretendidas, podendo incluir diversos tipos de corte: lâminas, fatias, rodela, cubos, pálidos, desfolhado ou ripado, tal como se apresenta na Figura 15.

A seleção das diversas misturas de hortícolas é realizada com base nos hábitos alimentares do consumidor e na compatibilidade em termos de conservação entre as matérias-primas em mistura. O tomate em rodela, a cenoura ripada, as alfaces em folha e os espinafres em folha, são preparados para serem comercializados isoladamente. A maçã fatiada e o abacaxi em pedaços são igualmente preparados isoladamente sendo os mais representativos dentro dos frutos. As misturas para sopas e os produtos inteiros descascados, como a batata, cenoura, cebola, nabo, alho francês, ocupam também lugar de destaque na oferta da empresa.



Figura 15. Exemplos de produtos hortofrutícolas minimamente processados laborados na empresa. a) Mistura de vegetais para saladas; b) Maçã fatiada; c) Cenoura ripada; d) Alface cortada

Na Figura 16, relativa ao diagrama geral de fabrico, assinalam-se os locais de eliminação da matéria vegetal, não incluída no produto final. É este material que na ótica deste trabalho vai constituir a matéria-prima base e o qual será designado por subprodutos. Destes fazem parte: matéria vegetal de qualidade deficiente e partes não edíveis dos hortofrutícolas, tais como cascas de frutos, folhas externas, talos, pedúnculos, entre outros.

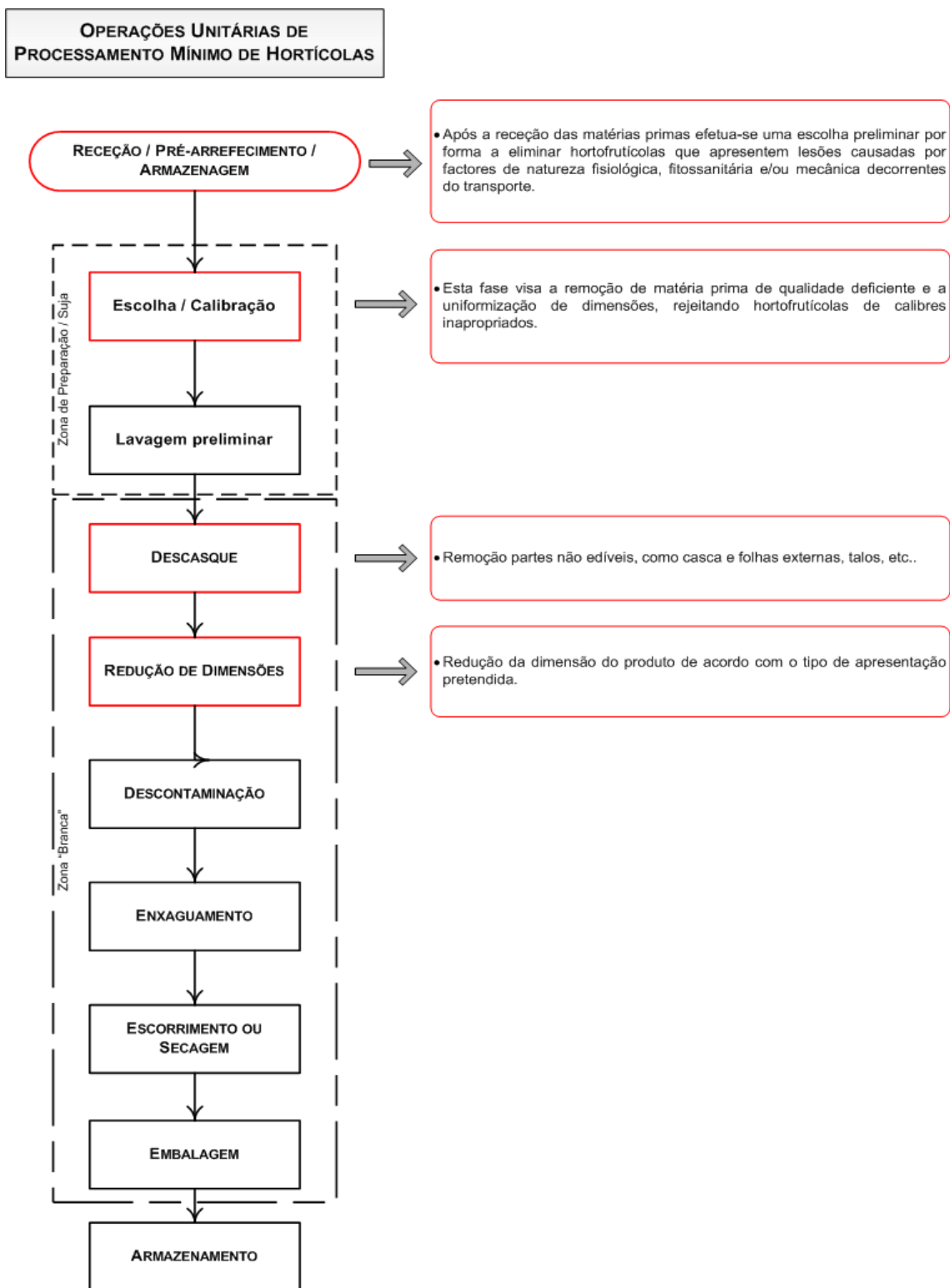


Figura 16. Etapas de eliminação de matéria vegetal (Adaptado de Alegria, 2007)

De acordo com a gama diversificada de produtos identificam-se, na Tabela 10, as matérias-primas utilizadas na respetiva preparação.

Tabela 10. Matérias-primas utilizadas na preparação dos diferentes produtos hortofrutícolas minimamente processados laborados na empresa

Hortofrutícolas minimamente processados	Matérias-primas
Misturas de hortícolas para saladas e/ou hortícolas preparados isoladamente	Acelga
	Alfaces (Chicória; Frisada; Iceberg; Mescla; Radichio; Multifolhas Verde e Multifolhas Roxa)
	Canónigos
	Cenoura
	Rúcula
	Tomate
Frutos	Abacaxi
	Maça
Produtos prontos a cozinhar (misturas para sopas ou outras preparações culinárias)	Agrião
	Alho
	Alho Francês
	Batata
	Cebola
	Couve Branca
	Couve-Galega
	Couve Lombardo
	Couve Roxa
	Espinafres
	Folhas de Brócolos
	Nabo

Os tipos de matérias-primas e volumes processados estão na dependência das épocas de colheita (sazonalidade) bem como pela procura no mercado. Por outro lado, o desperdício vegetal gerado é função da natureza da matéria-prima em questão sendo, na Tabela 11, apresentados os diferentes tipos de desperdícios, bem como as estimativas médias (%), por matéria-prima.

Tabela 11. Natureza dos desperdícios gerados e estimativas médias (%) por tipo de matéria-prima

Matéria-prima	Tipo de desperdício	% Desperdício
Agrião	Folhas, caules	75
Alfaces	Folhas, caules	30
Batata	Cascas, alterada	30
Cebola	Cascas, alterada	35
Cenoura	Cascas, extremidades, alterada	35
Couve Branca/ Couve Roxa	Folhas, caules	20
Couve-Galega	Folhas, caules	30
Couve Lombardo	Folhas, caules	30
Espinafres	Folhas, caules	20
Maça	Cascas, coração, alterada	25
Nabo	Casca, caule	35
Rúcula	Folhas, caules	10
Tomate	Pele, sementes, alterado	25

Na Tabela 12 são identificadas as classes de subprodutos consideradas e as matérias-primas que as compõem bem como a estimativa média (%) do respetivo volume de desperdícios gerados.

De acordo com a análise dos registos da empresa foram consideradas quatro classes de subprodutos: I - Batata, II - Cenoura, III - Frutos e IV - Folhosas, tendo por base a composição principal veiculada pelas diferentes matérias-primas utilizadas e a respetiva representatividade.

Tabela 12. Identificação das classes de subprodutos: I - Batata, II - Cenoura, III - Frutos e IV – Folhosas, e dos volumes (%) produzidos

Classes de Subprodutos	Matéria-Prima	Principais Fitoquímicos	% Desperdício
I - Batata	Batata	Amido	30
II - Cenoura	Cenoura	Carotenóides	40
III - Frutos	Tomate, Abacaxi, Maça	Compostos Fenólicos	25
IV - Folhosas	Agrião, Alfaces, Cebola, Couve Branca, Couve-galega, Couve Lombarda, Couve Roxa, Espinafres, Rúcula, Nabo.	Compostos fenólicos/ Fibra	30

Neste sentido o volume de batata laborada justificou a consideração de uma classe isolada (classe I), na qual o principal composto veiculado é o amido. Para o grupo da cenoura (classe II) utilizou-se o mesmo critério constituindo este tipo de subprodutos uma importante fonte de carotenóides. A classe III agrega subprodutos com origem em frutos, destacando-se nesta a composição fenólica. Neste grupo, não se assinalou o licopeno como possível marcador bioativo pelos volumes reduzidos de tomate laborados. Por último, a classe IV – Folhosas agrega uma diversidade de desperdícios cujo denominador comum se baseou no principal tipo de estrutura botânica rejeitada, folhas e pedúnculos, e cuja composição de interesse se centra igualmente nos compostos fenólicos.

Atendendo aos critérios definidos é possível observar (Tabela 12) a representatividade (%) dos desperdícios gerados das quatro classes definidas, 30, 40, 25, 30 para as classes I, II, III e IV respetivamente, e que se apresentam na Figura 17.



Figura 17. Classes de suprodutos: a) I - Batata; b) II - Cenoura; c) III – Frutos; d) IV – Folhosas

Na Tabela 13, apresentam-se os volumes médios laborados (por dia e mês) de matéria-prima e das classes de subprodutos gerados, bem como a respetiva representatividade na totalidade de subprodutos gerados (%).

Tabela 13. Representatividade mensal das diferentes matérias-primas e das classes de subprodutos

Classes de subprodutos	Matéria-Prima		Subprodutos		
	ton / dia	ton / mês	ton / dia	ton / mês	%
I - Batata	6,1	140,3	1,8	42,8	31
II - Cenoura	1,6	36,8	0,6	15,2	11
III - Frutos	4,2	96,6	1,1	24,8	18
IV - Folhosas	7,9	181,7	2,4	55,2	40
Total	20	460	6	138	

Os valores representam uma estimativa média diária da geração de subprodutos de ca de 6 toneladas (a partir de ca de 20 toneladas de matéria-prima laborada). Decorrente desta análise verificou-se que a classe de subprodutos com maior representatividade quantitativa foi a IV – Folhosas com 40%, seguida da I – Batata com 31%. A classe III - Frutos representa a terceira posição com 18%, e a classe II - Cenoura a menos representativa com apenas 11%.

Considerando que a empresa labora 23 dias úteis por mês, são laboradas ca de 460 toneladas de matéria-prima, o que representa um volume de desperdícios gerados de 138 toneladas.

5.1.3. Metodologias para a caracterização das classes de subprodutos

As diferentes classes de subprodutos (I, II, III e IV) foram constituídas em situação real de laboração nas linhas de processamento (recolhidas em palotes de plástico) e, transportadas até ao laboratório sem aplicação de qualquer tratamento (Figura 17).

À receção no laboratório foram constituídas aleatoriamente 3 amostras por classe de subproduto, que foram de imediato congeladas (temperatura de -10 °C) e mantidas nestas condições até ao dia de análise. Após descongelação *overnight*, seguiu-se a respetiva homogeneização (3 amostras) em separado (Rotomix, 1 min) as quais foram avaliadas face ao protocolo analítico estipulado: pH; Teor de Sólidos Solúveis (TSS); Cor CIELab; Teor de Humidade; Conteúdo Fenólico Total (CFT); Conteúdo em Carotenóides Totais (CCT); Capacidade Antioxidante em extratos hidrofílicos (AOxH) e Capacidade Antioxidante em extratos lipofílicos (AOxL). Os resultados referem-se à média de 3 determinações por amostra de cada classe de subproduto.

5.1.3.1. Resultados e discussão

Teor de Humidade, pH e TSS

Tal como era esperado de acordo com o teor de água das matérias-primas, o teor em água de todas as classes de subprodutos é muito elevado, a variar entre ca de 80 e 90%. Entre todas as classes de subprodutos, a da Batata foi a que registou valores mais baixos (de 77,7%), tendo as restantes apresentado valores superiores a 80%, de 93, 90 e 87,2%, na classe II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas, respetivamente (Tabela 14). Tendo em conta o teor de água elevado das matérias-primas, as diferenças assinaladas poderão ser justificadas pela quantidade variável de água utilizada na respetiva laboração (águas de lavagens), dando origem em consequência a diferentes diluições.

A quantidade elevada de água e as quantidades de nutrientes orgânicos e inorgânicos presentes nestes subprodutos promovem o desenvolvimento microbiano acelerado, tornando-os altamente perecíveis. Estas condições impõem dificuldades na respetiva armazenagem e transporte a longa distância. Na ótica da recuperação de fitoquímicos de interesse, os níveis de diluição excessivos e a natureza perecível, indicia à partida dificuldades nos processos de

extração, nomeadamente pela necessidade de envolver processos prévios de concentração e / ou descontaminação, agravando os custos do processo.

Tabela 14. Resultados médios ($\pm DP$) dos parâmetros TH, pH e TSS, nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas)

Tipo de subprodutos	Humidade (%)	pH	TSS (°Brix)
I - Batata	77,7 ^a \pm 0,4	5,2 ^c \pm 0,1	11,4 ^d \pm 0,2
II - Cenoura	93,0 ^d \pm 0,4	4,4 ^b \pm 0,1	4,2 ^a \pm 0,3
III - Frutos	90,0 ^c \pm 0,7	4,1 ^a \pm 0,1	7,9 ^c \pm 0,3
IV - Folhosas	87,2 ^b \pm 0,7	5,5 ^d \pm 0,1	7,1 ^b \pm 0,3

Na mesma coluna, letras diferentes correspondem a diferenças significativa a $p=0.05$ (teste Tukey HSD)

Relativamente aos registos de pH nos diferentes tipos de subprodutos (Tabela 14) constata-se que foram todos inferiores a pH 6, caracterizando-lhes um carácter ácido. Estes valores de pH baixo são referidos para subprodutos desta natureza, tal como se refere nos trabalhos desenvolvidos por Knol (1978), Lane (1979) e Bouallagui (2009).

O valor médio mais baixo (ca de 4), caracterizado na classe IV- Frutos, é justificado pela natureza ácida das matérias-primas (maçã, ananás e tomate). No entanto, as diferenças de valores de pH entre os diferentes subprodutos foram pequenas nunca excedendo, uma unidade. O valor de pH na classe II-Cenoura (4,4) é marcadamente inferior ao da respetiva matéria-prima (a variar entre 6,0-6,5). Este resultado poderá ser indicativo da ocorrência de fermentação láctica expressiva e responsável pela respetiva acidificação.

Do ponto de vista da recuperação de compostos bioativos, os valores de pH encontrados nos diferentes subprodutos representa uma vantagem porquanto esta condição limita o desenvolvimento de flora patogénica (desfavorecida a valores de pH baixo), facilitando eventuais operações de descontaminação preliminares aos processos extrativos.

Estes resultados de pH são também importantes do ponto de vista da valorização bioenergética uma vez que este parâmetro condiciona o tipo de desenvolvimento microbiológico e em consequência a eficiência do processo de digestão anaeróbio.

A comparação dos valores médios do teor de sólidos solúveis (°Brix) relativos às diferentes classes de subprodutos revela diferenças consideráveis entre as mesmas (Tabela 14). A classe I-Batata foi a que registou valores mais elevados (de 11,4 \pm 0,2), a classe II-Cenoura os valores mais baixos (de 4,3 \pm 0,3) e as classes III- Frutos e IV- Folhosas, valores intermédios (7,1 \pm 0,3 e 7,9 \pm 0,3, respetivamente).

Tendo em conta que para o teor de sólidos solúveis contribuem um conjunto de substâncias cuja predominância neste tipo de materiais são açúcares solúveis, os resultados caracterizados na classe I-Batata parecem incoerentes face ao valor característico atribuído à matéria-prima, de 5°Brix (Pineli *et al.*, 2005). Este facto poderá ser justificado pela ocorrência de reações de hidrólise ácida do amido em açúcares redutores. Foi verificada uma inconsistência semelhante

para o grupo IV-Folhosas, de composição muito heterogênea, em que os valores de TSS avaliados são claramente superiores face aos valores tendencialmente baixos de TSS verificados neste tipo de hortícolas folhosas (2-4 °Brix) (Silva *et al.*, 2011).

Observou-se uma tendência inversa para as classes II e III, em que os valores de TSS avaliados foram inferiores face aos valores característicos das matérias-primas que lhes deram origem, de 6 °Brix para a cenoura (Alves *et al.* 2010) e de 11-12 °Brix para a maçã (Argenta *et al.*, 1994) e 12-16 °Brix para o abacaxi (Bengozi *et al.*, 2007). Estas variações podem ser justificadas pelo fator de diluição decorrente da mistura dos desperdícios com as águas de lavagem.

Cor Cielab

Na Tabela 15 são apresentados os resultados da caracterização da cor através da avaliação da tonalidade (°h) e do índice de escurecimento (WI). Os parâmetros WI e h° são normalmente utilizados para descrever as alterações de cor manifestadas nos hortofrutícolas, nomeadamente o grau de escurecimento e a perceção de amarelecimento e/ou de acastanhamento. Neste sentido, esta determinação foi efetuada com o intuito de caracterizar indiretamente o grau de oxidação / escurecimento dos subprodutos.

Por observação visual das classes I, II e III é possível constatar níveis de escurecimento consideráveis face aos característicos das matérias-primas que lhes deram origem (Figura 17). Estas alterações são provavelmente atribuídas às reações enzimáticas da polifenoloxidase (PPO) sobre os substratos fenólicos na presença de oxigénio, que decorrem imediatamente após o descasque e corte dos tecidos vegetais. Na ótica da valorização em causa, a extensão destas reações oxidativas contribui de forma negativa para a diminuição da bioatividade dos subprodutos uma vez que envolve o consumo de substratos fenólicos.

Tabela 15. Resultados médios (± DP) dos parâmetros CIELab (°h e índice WI) da cor nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas)

Classe de subprodutos	°h	WI
I - Batata	73,9 ± 1,4	48,2 ± 1,6
II - Cenoura	59,7 ± 0,2	35,3 ± 0,6
III - Frutos	70,8 ± 2,5	30,7 ± 1,5
IV - Folhosas	120,9 ± 0,6	44,4 ± 1,7

Os valores angulares Hue (h°, *cf.* 4.1.3.) traduzem a perceção visual da tonalidade de cor. Os ângulos entre 0° e 90° correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos; de 90° a 180° os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180° a 270° os verdes, cianos e azuis; de 270° a 360° os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Dafne, *sd*).

Para a classe II o valor de h de 59,7 ± 0,2 indica uma tonalidade laranja-amarelo em concordância com a tonalidade laranja característica da cenoura. Da mesma forma, para a

classe IV o valor de h de $120,9 \pm 0,6$ indica uma tonalidade na gama do amarelo-verde, confirmando a tonalidade verde característica do material vegetal folhas.

Atividade Antioxidante, Conteúdo Fenólico Total e Conteúdo em Carotenóides Total

A capacidade contributiva dos compostos fenólicos totais (CFT) e dos carotenóides totais (CCT) para a atividade antioxidante, nas diferentes classes de subprodutos, bem como os resultados da capacidade antioxidante total (AOxT) e das frações de natureza hidrófila (AOxH) e lipófila (AOxL), são apresentados nas figuras 18, 19 e 20, e na Tabela 16, bem como no Anexo 1.

Da análise da Figura 18, verifica-se que só as classes III-Frutos e IV-Folhosas apresentam um teor fenólico total representativo. A classe III-Frutos, com valores de CFT médios de $328,9 \pm 25,5$ mg EAC.100 g⁻¹ foi de entre todas a que apresentou os teores mais elevados ($p < 0,05$), contabilizando valores *ca* de 14, 11 e 2 vezes superiores face às restantes, I, II e IV, respetivamente. A classe IV contabilizou valores de CFT de $204,9 \pm 38,2$ mg EAC.100 g⁻¹, e por último as classes I e II, sem diferenças significativas de CFT entre si, com valores de *ca* de 27 mg EAC.100 g⁻¹.

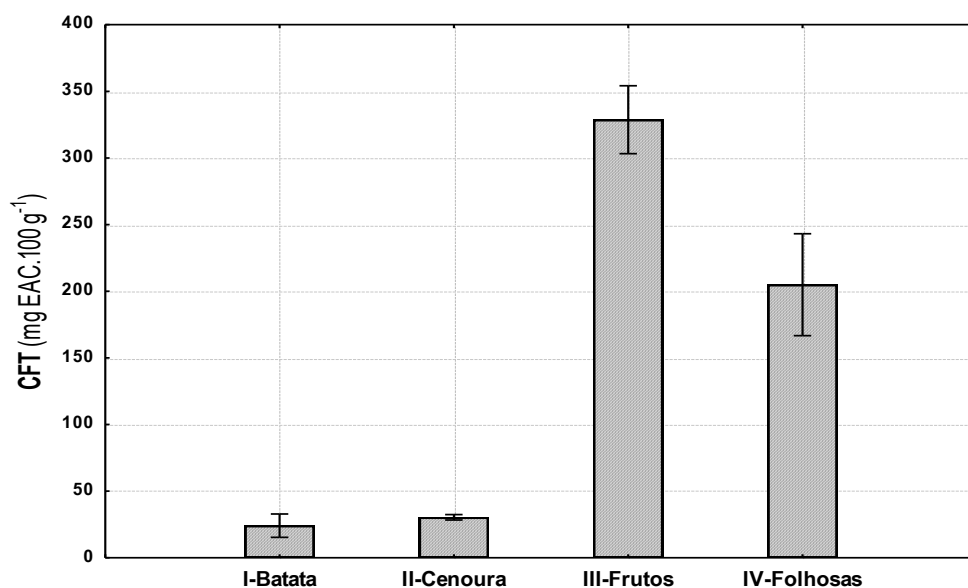


Figura 18. Teor fenólico total (mg EAC.100 g⁻¹) avaliado nas diferentes classes de substratos: I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas. Barras verticais correspondem ao desvio padrão

A superioridade de CFT nas classes III - Frutos e IV - Folhosas justifica-se pela natureza das matérias-primas, matéria vegetal que compõe as folhas, cascas e restos de polpa, que se sabem abundantes neste tipo de compostos. Os valores de CFT demasiado baixos caracterizados nas classes I e II podem ser justificados pela extensão das reações de oxidação enzimática tal como indicam os resultados da cor (*cf.* Tabela 15).

Em virtude destes resultados apenas os subprodutos das classes III e IV constituem potenciais fontes para a recuperação de compostos fenólicos.

Na Figura 19 destaca-se a classe II-Cenoura como a que apresenta teores em carotenóides totais (CCT) mais elevados, com valores médios de $5,5 \pm 0,3$ mg β -caroteno 100 g^{-1} . Seguiram-se as classes IV e III com teores inferiores de $4,7 \pm 0,9$ mg β -caroteno 100 g^{-1} e de $3,5 \pm 0,5$ mg β -caroteno 100 g^{-1} , respetivamente. Por último, os subprodutos da classe I-Batata foram os que registaram os níveis de CCT mais baixos ($p < 0.05$) de $1,2 \pm 0,4$ mg β -caroteno 100 g^{-1} . Esta ordenação é concordante com os teores em carotenóides expectáveis nas matérias-primas que integram as diferentes classes. Neste sentido são conhecidos os teores elevados em carotenóides na cenoura a variar entre $11,6\text{-}27,5$ mg β -caroteno. 100 g^{-1} (Gębczyński, 2006, Alegria *et al.*, 2012). Da mesma forma os frutos, nomeadamente o abacaxi e o tomate, possuem igualmente quantidades apreciáveis destes pigmentos (Andrade *et al.*, 2011; Pérez-Conesa *et al.*, 2009)

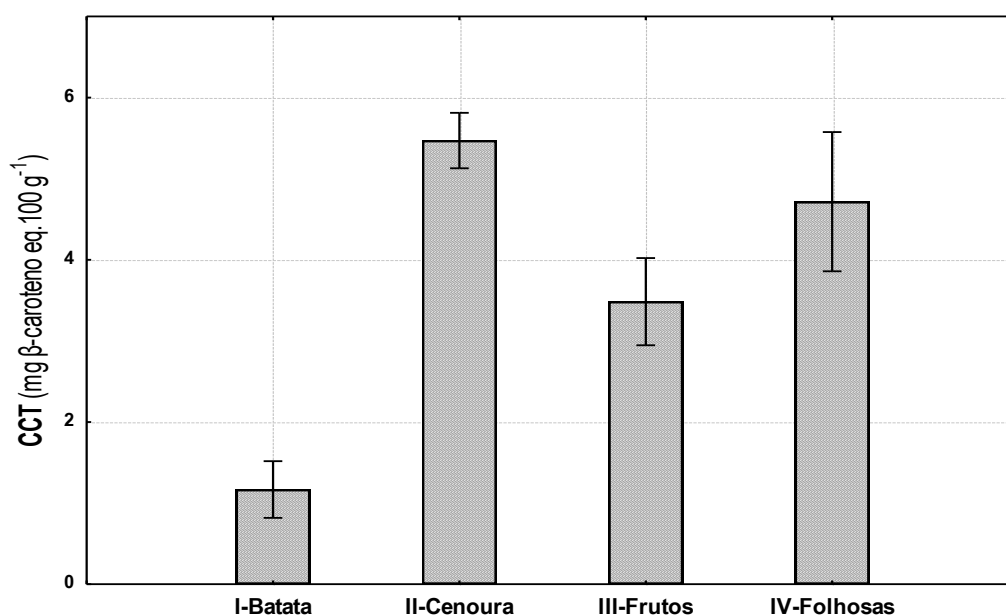


Figura 19. Teor de carotenóides total (mg β -caroteno eq. 100 g^{-1}) avaliado nas diferentes classes de I-Batata, II-Cenoura, III-Folhas e IV-Frutos. Barras verticais correspondem ao desvio padrão

Para a classe I os resultados são explicados tendo em conta a composição da batata vestigial em carotenóides. Quanto à classe IV-Folhosas estas considerações não podem ser estabelecidas dada a heterogeneidade das matérias-primas envolvidas.

Na Tabela 16 apresentam-se os resultados da capacidade antioxidante total, teores fenólicos e carotenóides totais, nos diferentes subprodutos.

As classes I e IV foram as que apresentaram registos mais elevados de capacidade antioxidante total, de $143,9 \pm 3,0$ mg EAC. 100 g^{-1} e de $150,4 \pm 18,1$ mg EAC. 100 g^{-1} , respetivamente, sem diferenças significativas entre si ($p > 0.05$). Verificaram-se valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) nas classes II e III, de $70,7 \pm 5,5$ mg EAC. 100 g^{-1} e de $81,8 \pm 10,1$ mg EAC. 100 g^{-1} , respetivamente.

Tabela 16. Capacidade antioxidante (AOxT) e conteúdo em fenólicos totais (CFT) e carotenóides totais (CCT) nas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-cenoura, III- Frutos e IV-Folhosas)

Classe de subprodutos	AOx_T mg ET.100 g ⁻¹	CFT mg EAC.100 g ⁻¹	CCT mg β-caroteno 100 g ⁻¹
I - Batata	143,9 ^a ± 3,0	24,1 ^a ± 8,8	1,2 ^a ± 0,4
II - Cenoura	70,7 ^b ± 5,5	30,4 ^a ± 2,0	5,5 ^c ± 0,3
III - Frutos	81,8 ^b ± 10,1	328,9 ^c ± 25,5	3,5 ^{bc} ± 0,5
IV - Folhosas	150,4 ^a ± 18,1	204,9 ^b ± 38,2	4,7 ^b ± 0,9

Na mesma coluna, letras diferentes correspondem a diferenças significativa a $p=0.05$ (teste Tukey HSD)

Pela figura 20, constata-se que, para todas as classes de subprodutos consideradas, a componente hidrofílica (fenólicos) excede em mais de 50% a fração lipofílica (carotenóides).

Relativamente à composição principal dos subprodutos da classe I-Batata, amido e ou açúcares redutores resultantes da sua hidrólise, não lhes é atribuída qualquer atividade antioxidante pelo que a AOx respetiva é considerada inesperadamente elevada. Uma possível justificação pode atribuir-se à presença de substâncias inorgânicas (solúveis em água), como é o caso do bissulfito de sódio utilizado nas operações de lavagem de carácter muito redutor.

Na classe II, o teor em carotenóides totais é o principal responsável pela AOx. Inversamente, nas classes III e IV, são os compostos fenólicos os principais responsáveis pela atividade antioxidante.

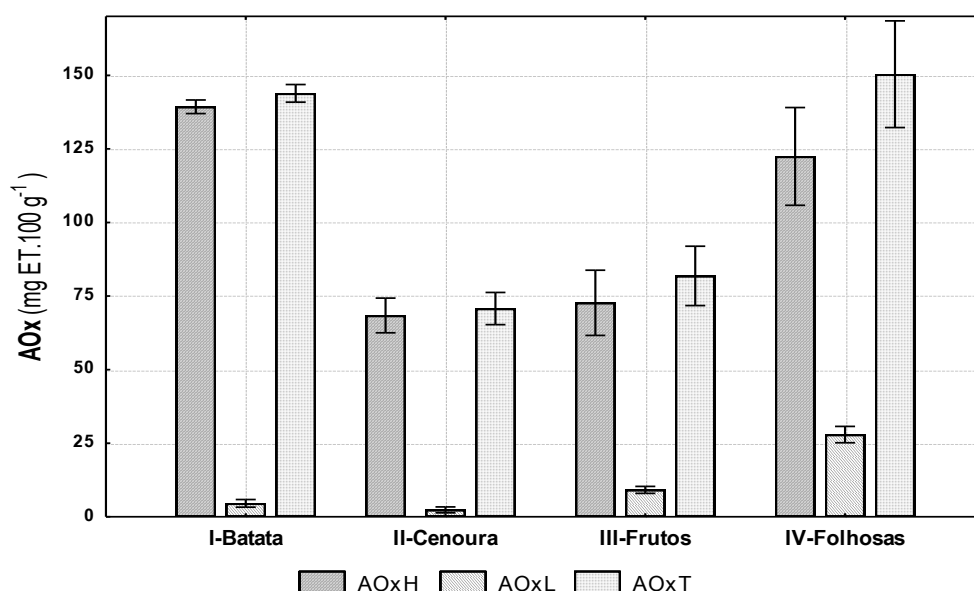


Figura 20. Capacidade antioxidante relativa às frações hidrofílica (AOxH); lipofílica (AOxL) e total (AOxT) avaliadas nas diferentes classes de I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas. Barras verticais correspondem ao desvio padrão

Em termos genéricos, estes resultados são consistentes com a relação entre estas frações (hidrofílica - fenólicos e lipofílica - carotenóides) presente nos hortofrutícolas (Deng *et al.*, 2012).

5.1.4. Conclusões intercalares

Os subprodutos hortofrutícolas apresentaram potencial de recuperação de compostos bioativos.

De acordo com a caracterização efetuada à empresa e aos subprodutos por ela gerados, resumiram-se as conclusões principais deduzidas:

- ⇒ A empresa de hortofrutícolas analisada apresenta um volume de laboração mensal de matérias-primas que corresponde, em média, de cerca de 460 toneladas.
- ⇒ Tendo por base a composição principal veiculada pelas diferentes matérias-primas e volumes laborados em contexto real da empresa foram definidas quatro classes: I - Batata, II - Cenoura, III - Frutos e IV – Folhosas.
- ⇒ Estima-se a produção de cerca de 138 toneladas/mês de subprodutos tendo em conta a percentagem média de desperdícios, entre as diferentes classes de subprodutos (de 30%), e o volume total de matéria-prima laborada na empresa.
- ⇒ A ordenação das classes de acordo com a respetiva representatividade na totalidade de subprodutos gerados (toneladas/mês) foi: IV – Folhosas (55,2 t/mês) < I – Batata (42,8 t/mês) < III – Frutos (24,8 t/mês) < II – Cenoura (15,2 t/mês).
- ⇒ As classes III-Frutos e IV-Folhosas foram as que demonstraram maiores potencialidades para a recuperação de compostos antioxidantes, designadamente de compostos fenólicos (329 ± 26 mg ET.100 g⁻¹ e 205 ± 38 mg ET.100 g⁻¹, respetivamente).
 - Estes subprodutos caracterizaram-se ainda por valores de pH baixo ($4,1 \pm 0,1$ e $5,5 \pm 0,1$, respetivamente), teor de sólidos solúveis baixos ($7,9 \pm 0,3$ °Brix e $7,1 \pm 0,3$ °Brix) e humidade elevada ($90,0\% \pm 0,7$ e $87,2\% \pm 0,7$).

5.2. Digestão anaeróbia: valorização dos subprodutos pela produção de biogás

5.2.1. Objetivos

A avaliação do potencial dos subprodutos hortofrutícolas enquanto substrato para a produção de biogás pelo processo de digestão anaeróbia foi o objetivo principal desta fase do trabalho. Após se agrupar por classes e caracterizar os subprodutos gerados pela empresa de hortofrutícolas minimamente processados em análise, propôs-se a formulação de uma mistura composta pelas diferentes classes de subprodutos (I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas), a ser utilizada como substrato no processo de DA. Uma vez que nas imediações da empresa em estudo se localiza uma indústria de transformação de leite em queijo, propôs-se ainda a utilização do soro de leite (subproduto) como substrato complementar.

- Objetivo 1** Formular uma mistura representativa das diferentes classes de subprodutos hortofrutícolas gerados na fábrica;
- Objetivo 2** Avaliar o potencial energético, pelo processo de DA, utilizando a mistura dos subprodutos hortofrutícolas como substrato;
- Objetivo 3** Avaliar o interesse de complementar a mistura de subprodutos hortofrutícolas com um produto proteico (soro de leite).

5.2.2. Materiais e metodologias

Mistura dos diferentes subprodutos hortofrutícolas. Os subprodutos da fábrica de hortofrutícolas minimamente processados, caracterizados e classificados anteriormente, correspondem ao principal subproduto testado no processo de digestão anaeróbia (Mix). Esta mistura foi realizada tendo por base a representatividade de cada uma das classes de subprodutos gerados na fábrica em relação à totalidade dos mesmos (*cf.* 5.1.2.1.). As proporções consideradas para a formulação da mistura foram 30%, 10%, 20% e 40%, para os subprodutos das classes I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos e IV-Folhosas, respetivamente (Figura 21a).

O Mix foi conservado a -10°C e posteriormente descongelado *overnight* antes da sua utilização.

Soro de leite. O soro de leite (SL) foi o produto proteico complementar utilizado na formulação das misturas de substratos a digerir, tendo sido proposta a utilização de duas concentrações de soro, SL₁ e SL₂ (Tabela 17 e Figura 21a).

Após rececionados no laboratório os soros foram armazenados sob condições de refrigeração.

Tabela 17. Composição percentual dos soros de leite nos seus principais componentes (SL₁ e SL₂)

Componentes	SL ₁	SL ₂
Matéria Gorda	0,1% (m/v)	0,3% (m/v)
Proteína Bruta	0,9% (m/m)	2,6% (m/m)
Lactose	5% (m/v)	19% (m/v)

Inóculo. Tendo em conta que o processo de digestão anaeróbia está dependente da atividade de diferentes populações de microrganismos recorreu-se a um inóculo de atividade assegurada. A lama recolhida do digestor anaeróbio da Estação de Tratamento de Águas Residuais de Frielas, concelho de Lisboa, serviu esse propósito.

O inóculo após rececionado foi armazenado sob condições de refrigeração. Previamente à sua utilização, foi aclimatado e sujeito a despressurização de forma a libertar algum gás existente no respetivo contentor.

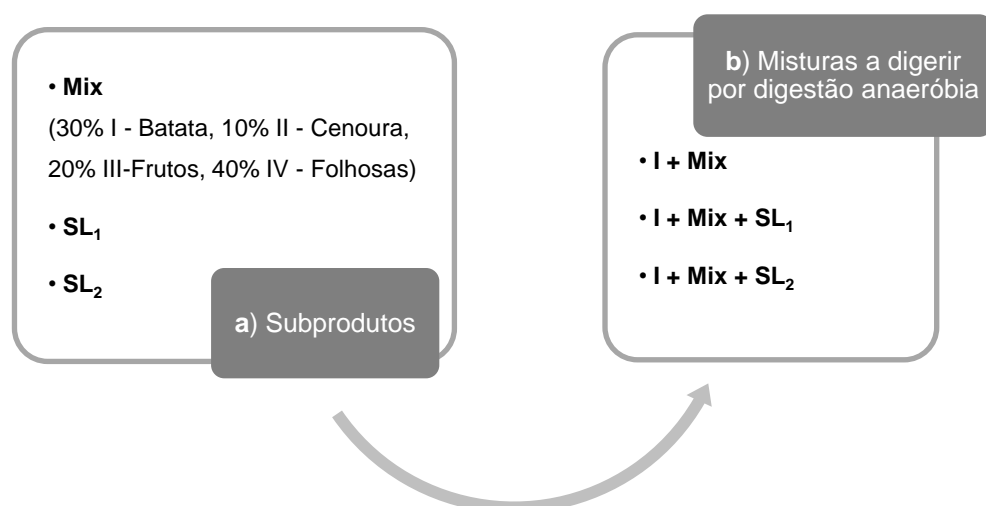


Figura 21. (a) Subprodutos e (b) formulação das misturas a digerir por digestão anaeróbia. (Mix – Mistura de subprodutos; SL- Soro de Leite)

Na Tabela 18, encontram-se caracterizados os diferentes subprodutos de fábrica (Mix, SL₁ e SL₂) e o inóculo utilizado no ensaio, tendo por base os resultados obtidos nas determinações analíticas de diferentes parâmetros (pH, CQO, ST, SV, SST, SSV, Azoto amoniacal e Azoto total).

Tabela 18. Caracterização dos subprodutos e do inóculo

ID Amostra	pH	CQO (g.L ⁻¹)	ST (g.L ⁻¹)	SV (g.L ⁻¹)	SST (g.L ⁻¹)	SSV (g.L ⁻¹)	Azoto amoniacal (g.L ⁻¹)	Azoto total (g.L ⁻¹)
Mix	5,1	121,9 ^a ± 1,0	150,3 ^b ± 35,5	116,1 ^a ± 0,2	66,8 ^c ± 7,8	67,0 ^a ± 7,1	0,05 ^a ± 9,3x10 ⁻³	0,8 ^a ± 3,7x10 ⁻²
SL ₁	5,8	85,4 ^b ± 1,0	75,9 ^a ± 0,6	70,3 ^b ± 0,6	9,6 ^{ab} ± 0,4	9,3 ^b ± 0,4	0,03 ^a ± 9,9x10 ⁻³	1,5 ^a ± 3,9x10 ⁻²
SL ₂	5,7	172,3 ^c ± 0,0	184,9 ^b ± 1,9	164,1 ^c ± 2,2	2,0 ^a ± 1,1x10 ⁻²	1,8 ^b ± 3,4x10 ⁻²	0,10 ^b ± 9,9x10 ⁻³	3,8 ^b ± 3,7x10 ⁻²
I	5,9	-	40,6 ^a ± 4,2x10 ⁻²	25,0 ^d ± 0,1	33,2 ^b ± 8,6	19,4 ^b ± 5,5	-	-

Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro de leite; I – Inóculo

Substratos para digestão anaeróbia

Com base nos resultados da caracterização dos subprodutos, formularam-se três misturas de substratos (Mix, Mix+SL₁ e Mix+SL₂). As misturas contendo soro de leite foram realizadas mantendo uma proporção fixa de Mix de 70% (v/v). Na preparação das unidades de digestão foi adicionado o inóculo às misturas de substratos, na proporção de 30% (v/v). Obtiveram-se as misturas a digerir (I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂), Figura 21b. Foi também preparada uma solução Controlo contendo apenas inóculo.

A fim de estabelecer condições operacionais de partida idênticas, a relação $CQO_{\text{substrato}} \cdot SV_{\text{inóculo}}^{-1}$ foi mantida constante no valor de 0,3 em todas as unidades.

Com base nos parâmetros estipulados e nos resultados analíticos obtidos na caracterização dos subprodutos foram determinados os volumes necessários na formulação das misturas. Na Tabela 19 encontra-se representada a composição percentual das misturas, bem como da solução Controlo.

Tabela 19. Composição percentual das misturas ensaiadas

ID Mistura	Mix (%)	SL ₁ (%)	SL ₂ (%)	I (%)	T (%)
Controlo	-	-	-	30,0	70,0
I + Mix	1,9	-	-	30,0	68,0
I + Mix + SL ₁	1,3	0,9	-	30,0	67,9
I + Mix + SL ₂	1,3	-	0,2	30,0	68,5

Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro de leite; I – Inóculo; T – Solução tampão

As misturas, num total de 200 mL, foram tamponizadas a pH 7 com uma solução de bicarbonato de sódio (3 g.L⁻¹). É de referir que, na respetiva preparação, e antes da introdução do inóculo, foi retirado o máximo de ar presente nos frascos, por lavagem com azoto no estado gasoso.

Na Tabela 20 encontram-se caracterizadas as diferentes misturas ensaiadas e a solução Controlo, tendo por base os resultados obtidos nas determinações analíticas de diversos parâmetros (pH, CQO, ST, SV, Azoto amoniacal e Azoto total).

Tabela 20. Caracterização das misturas a digerir e da solução Controlo

ID Mistura	pH	CQO (g.L ⁻¹)	ST (g.L ⁻¹)	SV (g.L ⁻¹)	Azoto amoniacal (g.L ⁻¹)	Azoto total (g.L ⁻¹)
Controlo	7,2	16,3 ± 1,7	13,1 ± 0,5	8,6 ± 0,1	0,14 ± 1,0x10 ⁻³	0,55 ± 3,0x10 ⁻³
I + Mix	7,1	18,6 ± 0,7	14,6 ± 0,1	9,9 ± 0,1	0,13 ± 1,0x10 ⁻³	0,58 ± 3,0x10 ⁻³
I + Mix + SL ₁	7,0	17,9 ± 0,6	15,2 ± 0,1	9,9 ± 0,1	0,09 ± 1,0x10 ⁻³	0,57 ± 3,0x10 ⁻³
I + Mix + SL ₂	6,9	18,1 ± 0,8	14,1 ± 0,1	9,2 ± 0,1	0,09 ± 1,0x10 ⁻³	0,59 ± 3,0x10 ⁻³

Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro de leite; I – Inóculo

Montagem experimental

Unidades de digestão em vidro com volume total de 71 mL, volume útil de 40 mL (Mistura substratos + Tampão + Inóculo), e um *headspace* de 31 mL, foram utilizadas no ensaio (Figura 22).

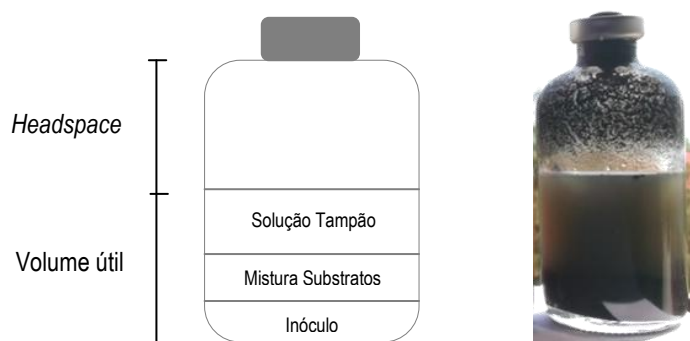


Figura 22. Unidade de digestão estabelecida

As diferentes condições experimentais foram testadas em triplicado. De cada uma das misturas de 200 mL foram transferidos 40 mL para cada um dos respetivos reatores. Estes foram em seguida fechados com rolhas butíricas e selados com capsulas de alumínio de forma a permitir a posterior retenção do biogás produzido e a sua medição, Figura 23. O excesso de oxigénio em cada uma das unidades foi eliminado por lavagem prévia com azoto no estado gasoso.

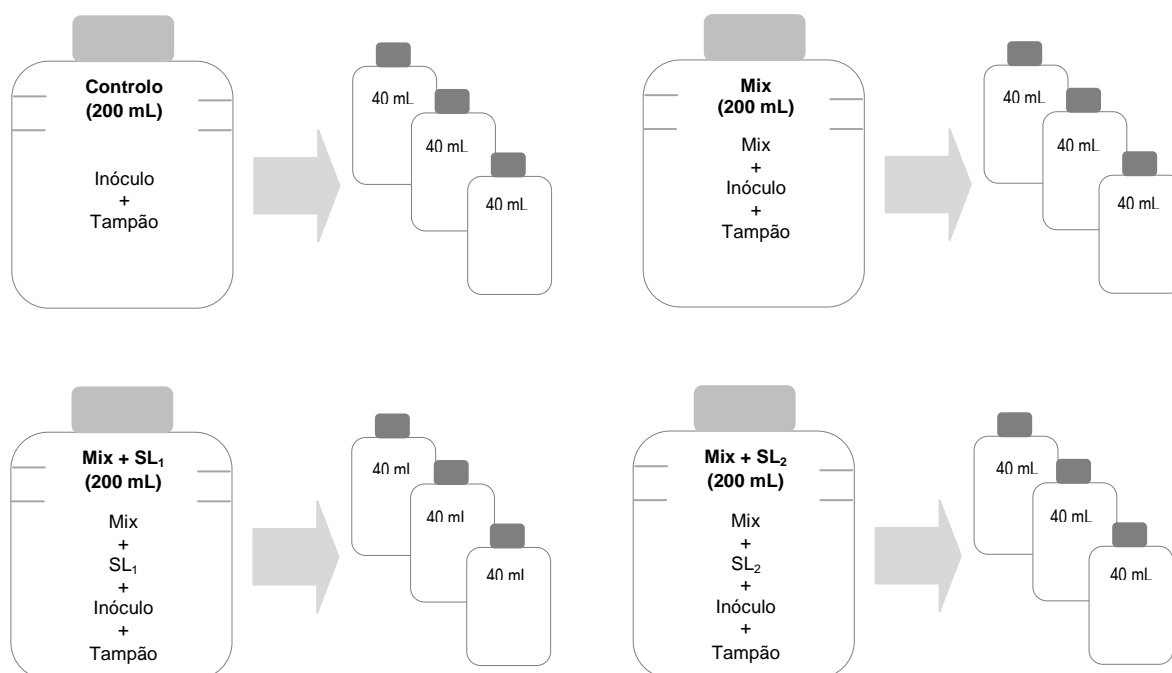


Figura 23. Esquema da preparação das soluções do processo de digestão (Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro de leite)

Os reatores foram colocados num reservatório de acrílico com água, em condições mesofílicas de temperatura (37°C), presos a estruturas de suporte, as quais permitiam que a parte superior dos frascos se mantivesse acima do nível da água. O reservatório de água foi conectado a um banho termostático (Jubalo), responsável por manter a água à temperatura desejada através da circulação da mesma. O caudal de água foi ajustado através de pinças ao longo das mangueiras do circuito.

A monitorização do volume de biogás foi realizada todos os dias do ensaio, sensivelmente à mesma hora, através da medição da pressão no interior de cada uma das unidades de digestão. Para o efeito foi utilizado um transdutor de pressão tendo por base o método desenvolvido na National University of Ireland, Galway (Colleran *et al.*, 1992).

Perfurou-se a rolha de borracha de cada um dos reatores, com a agulha do transdutor, após devidamente agitados, e registou-se o valor de mV indicado pelo equipamento. A conversão da pressão em mV para mL de biogás obteve-se pela aplicação de uma curva de calibração realizada no início do ensaio (Anexo 2). As produções em gás são apresentadas em condições normais de pressão e temperatura (0°C e 1 atm).

A caracterização da composição do biogás para as diferentes misturas foi realizada através de uma análise cromatográfica semanal, de acordo com o protocolo analítico estipulado.

As misturas de substratos foram caracterizadas antes e após o processo de digestão (dia 0 e dia 50 do ensaio), face ao protocolo analítico estipulado nos parâmetros: ST, SV, CQO, Azoto Amoniacal, Azoto Total, AGV e pH.

5.2.3. Resultados e Discussão

Subprodutos

pH. Todos os valores registados nos diferentes subprodutos apresentaram um carácter ácido com valores de pH inferiores a 6. No que se refere à comparação dos valores obtidos, constata-se que a diferença entre subprodutos é pequena e nunca excedeu uma unidade de pH. O pH do Mix foi o valor obtido mais baixo, o que está de acordo com o facto de os subprodutos sólidos vegetais que lhe deram origem apresentarem características ácidas (cf. 5.1.3.1.).

CQO. Os teores de matéria-orgânica dos diferentes subprodutos em estudo (Mix, SL₁ e SL₂) foram elevados, tendo-se registado concentrações em CQO entre 85 e 172 g.L⁻¹. Estes valores apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) sendo o SL₂ o que apresentou uma concentração mais elevada ($172,3 \pm 0,0$ g.L⁻¹) e o SL₁ a mais baixa, de cerca de metade do anterior (Tabela 17). Valores da mesma ordem de grandeza são referidos por Gelezenis (2007) ao obter um CQO de 74,9 g.L⁻¹ para o soro de leite.

O valor de CQO do Mix ($121,9 \pm 1,0$ g.L⁻¹), principal substrato do processo, encontra-se dentro da gama de valores verificada por Bouallagui *et al.* (2005) e Bouallagui *et al.* (2009) que obtiveram concentrações de 104,5 e 162 g.L⁻¹ para uma mistura de subprodutos hortofrutícolas com composição semelhante à estudada (batata, folhosas, ervilhas e cenoura) e para uma mistura de subprodutos oriundos de um mercado de venda de hortofrutícolas, respetivamente.

Sólidos (ST, SV, SST e SSV). Todos os subprodutos analisados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao teor de sólidos. O SL₂ foi o subproduto que apresentou valores mais elevados de SV, com $164,1 \pm 2,2$ g.L⁻¹ (92% dos ST) e o SL₁ os valores mais baixos com $70,3 \pm 0,6$ g.L⁻¹ (89% dos ST) podendo assim afirmar-se que a grande parte dos sólidos destes materiais encontra-se na forma volátil. Comparativamente aos restantes, o Mix apresenta uma percentagem inferior de material volátil (77% dos ST $\approx 116,1 \pm 0,2$ g.L⁻¹), contudo dentro da gama de valores de 75 a 90%, referida por Bouallagui *et al.* (2005) e Bouallagui *et al.* (2009). Tendo em conta que o teor de SV é um indicador da quantidade de matéria que pode ser potencialmente destruída por via biológica, os valores obtidos indicam que os substratos são potencialmente biodegradáveis e que esta característica apresenta maior expressividade nos subprodutos proteicos.

A relação $SSV.SST^{-1}$ foi de 1 para o Mix e SL₁ e de 0,9 para o SL₂. Contudo, apesar de a relação $SSV.SST^{-1}$ ser da mesma ordem de grandeza, o Mix distingue-se dos outros dois subprodutos por apresentar uma maior porção de material em suspensão na forma volátil (67g $SSV.L^{-1} \approx 44,5\%$ ST). Os subprodutos proteicos sugerem necessitar de um processo de hidrólise mais acentuado comparativamente ao Mix, uma vez que apresentam porções mais reduzidas de SSV no total de sólidos (Tabela 18).

De entre os subprodutos proteicos, apesar de o SL₂ apresentar um teor superior em CQO e ST relativamente ao SL₁, este último tem um teor de material volátil em suspensão ca de 5 vezes maior. Pressupõe-se que este seja potencialmente de mais fácil degradação.

Azoto Total e Azoto Amoniacal. Da análise do azoto total constata-se que o SL₂ apresenta um contributo em azoto superior (3,8 g azoto total.L⁻¹) em ca de 2,5 e 5 vezes as concentrações do SL₁ e do Mix, respetivamente (p<0,05). Este resultado já era esperado, uma vez que o SL₂ advém de um processo de concentração do soro SL₁, apresentando na sua composição maior quantidade de proteína, logo maiores proporções em azoto (Macedo, 2010).

Por sua vez, ao azoto amoniacal, que avalia a presença de amoníaco (NH₃) e do ião amónia (NH₄⁺), correspondem valores com variações significativas (p<0,05) entre o subproduto SL₂ (com 0,10 ± 9,9x10⁻³ g.L⁻¹) e o Mix e SL₁ (com 0,05 ± 9,3x10⁻³ g.L⁻¹ e 0,03 ± 9,9x10⁻³ g.L⁻¹, respetivamente).

Inóculo

O inóculo apresenta um pH ácido próximo dos valores de pH verificados nos subprodutos. O teor de SSV de ca de 20 g.L⁻¹ indica a existência de uma carga de biomassa microbiana em que a maior parte dos sólidos em suspensão são voláteis (SV.ST⁻¹ e SSV.SST⁻¹ de 0,6).

Performance do Processo

Os resultados obtidos nas determinações efetuadas para caracterização das misturas testadas, no dia 0 e no dia 50, e posterior avaliação da performance do processo, encontram-se representados na Figura 24 e Tabela 21.

pH. Não foram verificadas diferenças nos valores de pH iniciais nas misturas a digerir. Este facto é relacionável com as correções a pH 7 realizadas na preparação das misturas.

Uma das principais limitações da utilização de subprodutos hortofrutícolas num processo de digestão anaeróbia é a sua rápida acidificação levando a que ocorra uma diminuição do pH no reator e a uma maior produção de ácidos gordos livres, o que por sua vez dificulta a atividade das metanogénicas (Bouallagui *et al.*, 2005). Terminado o ensaio de DA, os valores de pH decresceram ligeiramente, tendo-se contudo mantido próximos dos iniciais (≈ pH 7). Conclui-se que não ocorreram oscilações assinaláveis neste parâmetro antes e após o processo, Figura 24 a).

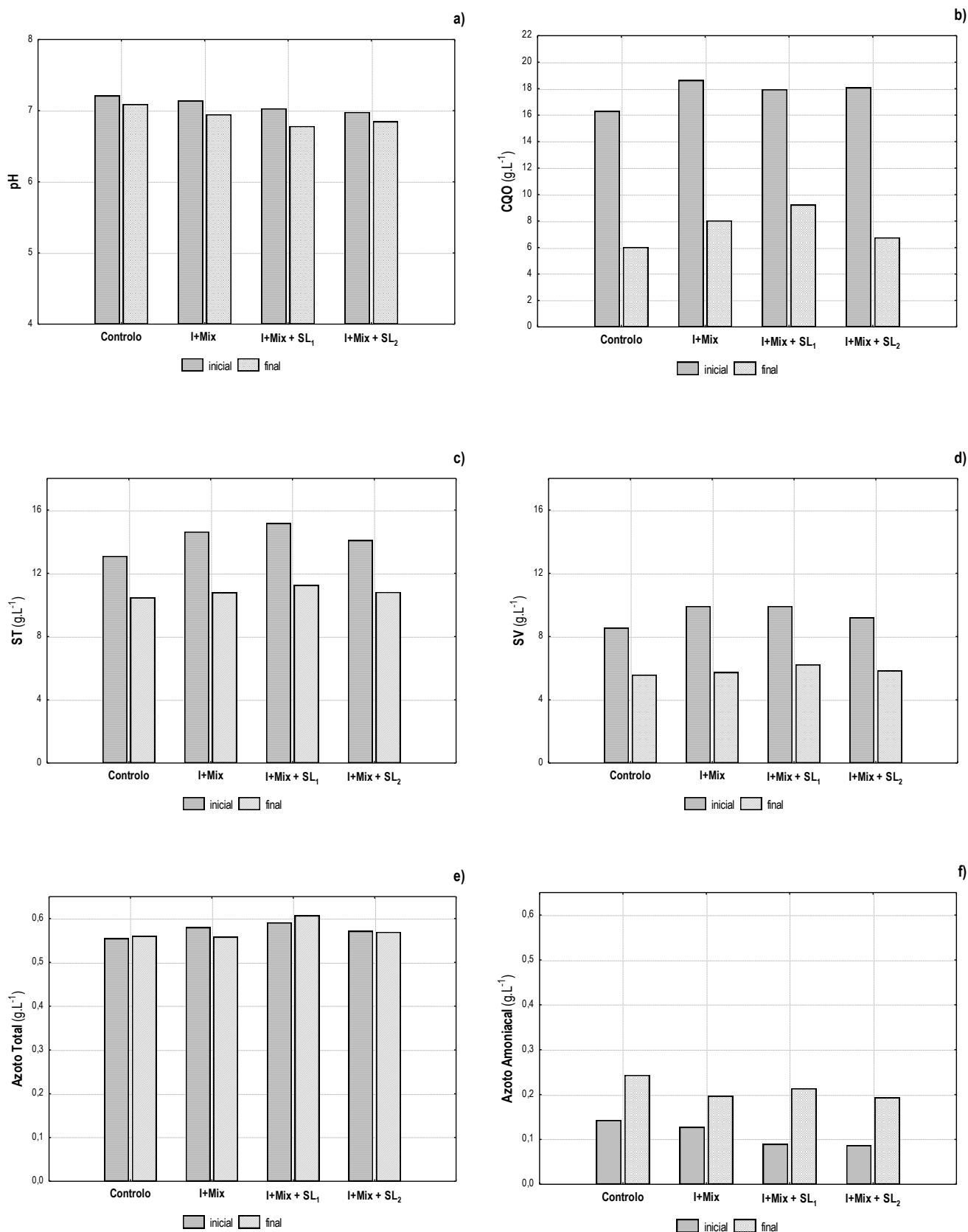


Figura 24. Caracterização das diferentes soluções no início e no final do processo de digestão. a) pH; b) CQO; c) ST; d) SV; e) Azoto total e f) Azoto Amoniacal. (I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite).

CQO. As misturas iniciais apresentavam valores de CQO próximos entre si, de ca de 18 g.L⁻¹ (Figura 24 b). Sabendo que a carga orgânica fornecida na alimentação do digestor depende da composição dos substratos presentes na mistura (Igoni *et al.*, 2008) e que as misturas deste processo apresentam proporções diferentes dos subprodutos em estudo, os CQO's iniciais semelhantes justificam-se pelo ajuste da razão $CQO_{\text{substrato}}/SV_{\text{inóculo}}$ efetuado às misturas. Tal como esperado, após os 50 dias de digestão, as misturas apresentaram CQO mais baixo. Valores de $8,0 \pm 0,2$ g.L⁻¹, $6,8 \pm 0,3$ g.L⁻¹ e $9,2 \pm 1,9$ g.L⁻¹ foram registados para a I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂, respetivamente.

A maior eficiência de remoção de CQO constatou-se na mistura I+Mix+SL₂ com 62%, e a menor para a I+Mix+SL₁ com 48%, Tabela 21. Tendo em conta que o processo de digestão anaeróbia é capaz de remover entre 40 a 90% da matéria-orgânica presente num determinado substrato (CCE, 2000), verifica-se que os valores obtidos se encontram dentro da gama de eficiências mencionadas.

Sólidos (ST e SV). As misturas em estudo apresentavam inicialmente um teor em SV superior ao teor em SV do Controlo, com ca de 9 g.L⁻¹. Em todas elas os sólidos voláteis correspondem a ca de 65% dos ST, como se verifica pela análise da Figura 24 c) e d). Após o processo verificou-se em todas as misturas uma diminuição do teor de ST, que não excedeu os 26%, tendo a eficiência de remoção de SV sido superior à dos ST (37- 42%). A mistura apenas com Mix como substrato foi a que apresentou uma maior remoção em SV relativamente às outras duas misturas (42% vs 37% SV), Tabela 21.

Tabela 21. Eficiências de remoção do processo de digestão

ID Mistura	CQO (%)	ST (%)	SV (%)
Controlo	63,0 (0,41*)	20,1	34,7
I+Mix	56,9 (0,42*)	26,3	42,2
I+Mix+SL ₁	48,6 (0,35*)	25,8	37,2
I+Mix+SL ₂	62,6 (0,45*)	23,2	36,5

I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite; *CQOr em g.L⁻¹

Azotos. Verificou-se que as soluções iniciais apresentavam teores de azoto total semelhantes entre elas e ao Controlo, com ca de 0,60 g.L⁻¹ (Figura 24e). Não se verificaram alterações significativas nos valores finais de azoto total em nenhuma das misturas. Já no que se refere ao azoto amoniacal, as soluções iniciais foram também elas semelhantes, apresentando um valor médio de 0,1 g.L⁻¹. Após os 50 dias de reação constatou-se que o azoto amoniacal aumentou em todas as soluções testadas para ca do dobro (Figura 24f). O valor final foi de aproximadamente 0,2 g.L⁻¹ em todas as misturas. Este facto ilustra as alterações que ocorrem nos compostos orgânicos dos substratos e indica a existência da respetiva conversão.

Ácidos Gordos Voláteis. A concentração em AGV decresce ao longo de um processo de digestão anaeróbia e encontra-se associada à produção de CH₄ (Ghaly e Ramkumar, 1999). É também conhecido que a concentração de AGV é um dos parâmetros vulgarmente utilizado para a indicação da ocorrência de sobrecargas orgânicas e da inibição da atividade dos microrganismos responsáveis pela degradação dos produtos intermediários ácidos (Hansen e Cheong, 2007).

Tendo em conta a conversão de todos os AGV analisados em ácido acético, constatou-se que não ocorreu inibição da atividade microbiana pela presença dos AGV, verificando-se remoções superiores a 80% (Tabela 22). As misturas I+Mix e I+Mix+SL₁ foram as que apresentaram inicialmente maiores concentrações em AGV (2794 mgC₂.L⁻¹ e 2776 mgC₂.L⁻¹ respetivamente), sendo que a maior eficiência de remoção foi para a I+Mix+SL₁ com 99% vs 80,5%.

Tabela 22. Total de ácidos gordos voláteis expressos em ácido acético e em CQO. Eficiência total de remoção.

ID Mistura	Fase	AGV (mg C ₂ .L ⁻¹)	AGV _r (C ₂ %)	AGV (CQO g.L ⁻¹)	CQO* (g.L ⁻¹)	AGV (CQO %)
Controlo	Inicial	3482	90,3	5,0	16,30	30,7
	Final	336		0,4	6,03	6,6
I + Mix	Inicial	2794	80,5	3,9	18,63	20,8
	Final	544		0,9	8,04	11,2
I + Mix + SL ₁	Inicial	2776	99,0	3,8	18,08	21,1
	Final	28		0,0	6,76	0,5
I + Mix + SL ₂	Inicial	1551	92,5	2,1	17,95	11,8
	Final	117		0,2	9,22	2,2

C₂ – Ácido acético; C₃ – Ácido propiónico; IC₄ – Ácido isobutírico; C₄ – Ácido butírico; IC₅ – Ácido isovalérico; C₅ – Ácido valérico; I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite; r – removido; * Valores obtidos por determinação analítica

Da conversão do teor de AGV total em CQO constatou-se igualmente que as misturas I+Mix e I+Mix+SL₁ eram as que continham maior de teor de ácidos gordos voláteis disponíveis na carga orgânica inicial. Esta constatação demonstra que apesar de a carga orgânica inicial ter sido estabelecida igual entre todas as misturas, estas apresentavam composição diferente.

Avaliando em particular as eficiências de consumo dos diferentes ácidos analisados verifica-se que o ácido acético foi o componente mais representativo em qualquer uma das misturas iniciais, presente em concentrações de 900 mg.L⁻¹ para I+Mix e I+Mix+SL₂ e 600 mg.L⁻¹ para I+Mix+SL₁ (Tabela 23). O respetivo consumo foi quase total (ca de 99%) em todas as misturas de substratos. O ácido propiónico (C₃) e butírico (C₄) foram os outros dois ácidos gordos voláteis mais expressivos.

De entre todas as misturas, a que continha SL₂ foi a que apresentou inicialmente maiores quantidades de C₃ e C₄. Segundo Macedo (2010) o soro de leite contém ácidos gordos livres, principalmente os de cadeia curta (entre C₄ e C₆). Consequentemente é de supor que os ácidos gordos livres tenham uma maior expressão num soro mais concentrado. Este parâmetro

poderia indicar à partida uma maior dificuldade de estabilidade no processo de digestão na mistura I+Mix+SL₂. Contudo, verificaram-se remoções superiores a 99% para estes ácidos, indicando efetivamente que os ácidos parcelares foram convertidos. Revela-se assim, a existência de condições de eficiência quanto à ação dos microrganismos hidrogenotróficos, fator preponderante por exemplo na conversão do C₃.

Tabela 23. Valores médios dos ácidos gordos voláteis (mg.L⁻¹) das misturas no início e no final do processo de digestão

ID	Fase	C ₂		C ₃		IC ₄		C ₄		IC ₅		C ₅	
Mistura		(mg.L ⁻¹)	%	(mg.L ⁻¹)	%	(mg.L ⁻¹)	%	(mg.L ⁻¹)	%	(mg.L ⁻¹)	%	(mg.L ⁻¹)	%
Controlo	Inicial	1000		700		200		600		300		400	
	Final	200	83,7	n.d	100,0	n.d	100,0	100	81,6	n.d	100	n.d	100
I+Mix	Inicial	900		700		200		600		200		n.d	
	Final	10	98,8	200	73,5	n.d	100,0	100	84,4	200	1,4	n.d	n.d
I+Mix+SL ₁	Inicial	900		800		200		700		n.d		n.d	
	Final	10	98,9	5	99,4	n.d	100,0	10	97,3	n.d	n.d.	n.d	n.d.
I+Mix+SL ₂	Inicial	600		500		100		300		n.d		n.d	
	Final	10	98,4	100	76,4	n.d	100,0	10	94,1	10	n.d.	n.d	n.d.

C₂ – Ácido acético; C₃ – Ácido propiónico; IC₄ – Ácido isobutírico; C₄ – Ácido butírico; IC₅ – Ácido isovalérico; C₅ – Ácido valérico; I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite; n.d. – não detetado. Na mesma coluna, letras diferentes correspondem a diferenças significativas num intervalo de confiança a 95%

Produção em gás. Da análise do perfil da produção de biogás para as diferentes combinações de substrato, verifica-se uma evolução crescente no volume de gás gerado ao longo do tempo, tendo a produção sido mais acentuada a partir da 2ª semana (Figura 25). Valores de ca de 75 mL foram registados no dia 15 nos diferentes digestores, os quais mostram a existência de diferenças significativas das misturas em relação ao Controlo ($p < 0,05$), que apresentou um volume de biogás de ca de 51 mL.

Decorridos 35 dias de processo, verificaram-se valores na produção de biogás de $131,3 \pm 3,1$ mL, $142,4 \pm 5,0$ mL e $147,8 \pm 5,2$ mL para as soluções I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂, respetivamente, e $123,1 \pm 3,9$ mL para o Controlo, sem variações significativas ($p > 0,05$).

Constatou-se que, após 35 dias de ensaio o Controlo revelava um esgotamento da matéria convertível, tendo-se registado um volume constante de biogás ao longo do restante tempo do ensaio. As misturas de substrato por seu turno continuaram a proporcionar ligeiros aumentos na produção de biogás. No último dia do processo, o volume de biogás produzido não foi significativamente diferente entre cada uma das misturas ($p > 0,05$) e os valores finais corresponderam a $147,2 \pm 3,1$ mL, $160,2 \pm 8,2$ mL e $155,5 \pm 8,2$ mL, para a I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂, respetivamente.

No que se refere à composição do biogás produzido, foi detetada uma boa qualidade do mesmo tendo-se verificado uma evolução crescente na quantidade de metano presente (Figura 26).

Decorridos 15 dias de processo todas as misturas apresentaram volumes de metano superiores aos verificados no Controlo ($p < 0,05$), contudo sem diferenças significativas entre elas. Em todas elas obtiveram-se valores de metano na ordem dos 30 mL, tendo este valor aumentado ca de 4 vezes nos quinze dias seguintes, atingindo-se produções de ca de 120 mL. A quantidade de metano obtida passado um mês de ensaio manteve-se constante nos 5 dias seguintes, tanto no Controlo (com $94,8 \pm 7,0$ mL CH_4 , no dia 29) como nas misturas de substratos (com $108,4 \pm 4,9$ mL CH_4 , $118,5 \pm 9,4$ mL CH_4 e $124,7 \pm 9,3$ mL CH_4 no dia 29, para o I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂ respetivamente), sem variações significativas entre misturas ($p > 0,05$). Após os 35 dias ocorreram uma série de oscilações em todas as soluções em estudo. É contudo de referir, que nas misturas de substratos que continham soro de leite (I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂) foi registada uma evolução positiva quanto à produção de metano após este período, ao contrário do que aconteceu com a unidade apenas com Mix.

Da análise conjunta da produção de biogás e de metano é ainda possível verificar certos comportamentos distintos nas misturas durante o decorrer do ensaio. Analisando as misturas complementadas com soro de leite, verificou-se uma ligeira tendência para a produção de metano mais rápida na I+Mix+SL₁, o que poderá indicar uma melhor adaptação por parte desta mistura. O teor inicial em AGV superior nesta mistura comparativamente à I+Mix+SL₂ poderá ter proporcionado este comportamento (Tabela 22). Contudo, após ca de um mês de ensaio, a I+Mix+SL₂ revelou um certo comportamento positivo para a produção de biogás e metano produzidos. É sabido que a concentração de material lipídico fornece uma maior quantidade de gás quando comparado com as proteínas ou hidratos de carbono (Guttler, 2012). Este comportamento por parte da I+Mix+SL₂ pode ser relacionado com o facto de o soro em digestão conter uma maior concentração de matéria lipídica comparativamente à I+Mix+SL₁ e, por isso, embora necessite de mais tempo para a respetiva degradação possa vir a apresentar um maior volume de gás/metano.

Com base nos resultados obtidos, o prolongamento do ensaio após ca de um mês apresenta-se desprovido de interesse, uma vez que posteriormente não ocorreu um aumento significativo no volume de metano produzido.

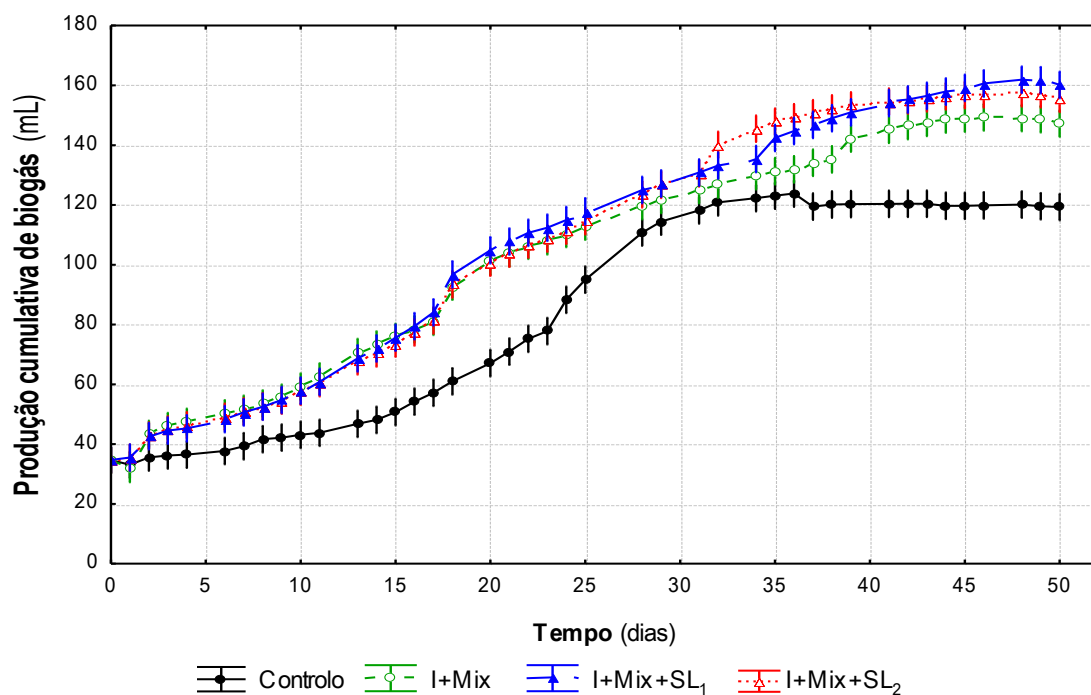


Figura 25. Produção cumulativa de biogás (mL) para as soluções testadas (I+Mix, I+Mix + SL₁, I+Mix + SL₂) e para o Controlo. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%

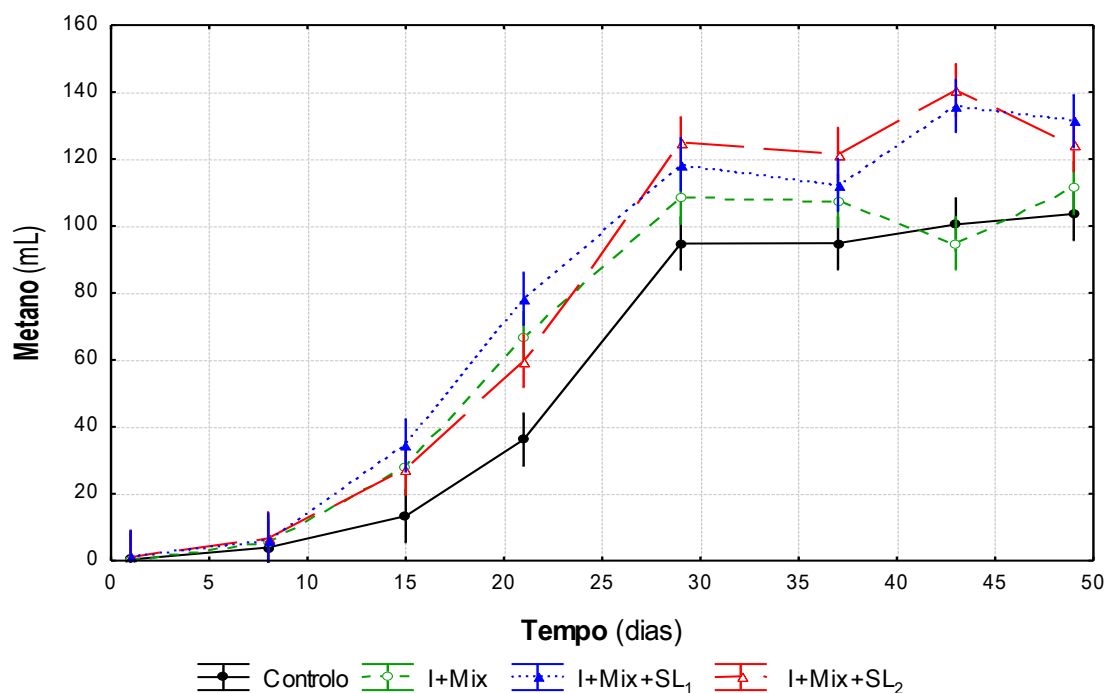


Figura 26. Produção de metano (mL) para as soluções testadas (I+Mix, I+Mix+SL₁, I+Mix+SL₂) e para o Controlo. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%

Um aspeto de importância relevante foi o surgimento de uma coloração avermelhada em todas as unidades de digestão após cerca de um mês de experiência, a qual se foi intensificando até ao término do ensaio (Figura 27).



Figura 27. Fenômeno de coloração vermelha após o ensaio de digestão

A coloração avermelhada poder-se-á atribuir ao aparecimento de uma nova cultura que apenas nesta altura do processo revelou ter condições para se desenvolver. Uma vez que as unidades Controlo também apresentaram esta coloração atípica pressupõe-se que esta esteja relacionada com o tipo de inóculo utilizado ou com o facto de as unidades terem sido sujeitas a uma contaminação exterior (por exemplo, através da agulha do transdutor ou da amostragem do gás para cromatografia).

Tendo em conta que o período em que surge a cor vermelha é coincidente com o período de alterações na produção de biogás e consequentemente de metano, pressupõe-se que este fenómeno tenha influenciado o processo. O facto de não terem sido verificadas alterações no azoto total nas misturas finais poderá estar também relacionado com este fenómeno.

Complementando a anterior discussão da produção de gás, apresenta-se a composição percentual do gás gerado após um mês (dia 29) e no final do ensaio (dia 49), referente ao CH_4 e aos restantes componentes gasosos avaliados, CO_2 , O_2 , N_2 , H_2 e H_2S (Tabela 24).

O metano é o componente mais expressivo na composição do biogás em todas as misturas, como esperado e já verificado, seguindo-se o dióxido de carbono na gama de valores de 20 a 30%. É ainda de salientar que não foram detetados H_2 nem H_2S na composição do biogás. Isto sugere a inexistência de fenómenos de inibição relativos à formação de CH_4 . As bactérias hidrogenotróficas revelaram um bom desempenho na remoção do H_2 do meio e, por seu turno, as sulfato-redutoras não expressaram competição com as metanogénicas.

Observando as diferenças da composição do gás entre o dia 29 e o dia 49 verifica-se que só o Controlo apresentou aumento na percentagem de metano, uma vez que nas restantes misturas ensaiadas esta decresceu. Também as quantidades dos restantes componentes diminuíram. O N_2 foi maior no período inicial do ensaio devido ao procedimento de lavagem com azoto quando da montagem da experiência. Após a anterior discussão reforça-se, para as condições ensaiadas, o não interesse de prolongar o processo de DA para além de ca de um mês.

Tabela 24. Composição do biogás após um mês e no final do ensaio

ID Mistura	Dia	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	N ₂ (%)	H ₂ (%)	H ₂ S (%)
Controlo	29	65,1	21,4	n.d.	11,8	n.d.	n.d.
	49	68,8	18,3		4,3		
I+Mix	29	69,5	29,8	n.d.	7,0	n.d.	n.d.
	49	62,0	26,1		2,2		
I+Mix+SL ₁	29	73,1	29,3	n.d.	5,4	n.d.	n.d.
	49	68,0	22,9		1,5		
I+Mix+SL ₂	29	77,1	30,1	n.d.	6,3	n.d.	n.d.
	49	65,8	21,0		1,7		

CH₄ – Metano; CO₂ – Dióxido de Carbono; O₂ – Oxigénio; N₂ – Azoto, H₂ – Hidrogénio e H₂S-Sulfato de hidrogénio; I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite

Eficiência do processo em gás. Os rendimentos do processo de digestão anaeróbia das diferentes misturas foram calculados para o dia 29 e 49 do ensaio (Tabela 25). Os volumes de biogás produzidos por massa em digestão ao 29º dia foram, por ordem decrescente, de 3,27 L.L⁻¹ para o I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂ e, de 3,13 L.L⁻¹ para o I+Mix. Estes comportamento manteve-se igual no dia 49, com volumes de biogás de aproximadamente 4 L.L⁻¹ para todas as misturas. Os volumes em metano foram mais expressivos nas misturas que continham soro.

Tabela 25. Rendimentos do processo (massa total em digestão)

ID Mistura	Dia	CQO _r (%)	Biogás (L.L ⁻¹)	CH ₄ (L.L ⁻¹)	Y Biogás (L. g ⁻¹ SV _i)	Y CH ₄ (L. g ⁻¹ CQO _r)	Y CH ₄ (L. g ⁻¹ SV _i)
Controlo	29	41,5	2,86	2,37	0,34	-	0,28
	49	63,0	2,99	2,59	0,35	0,252	0,30
I+Mix	29	41,6	3,13	2,71	0,32	-	0,27
	49	56,9	3,72	2,78	0,38	0,263	0,28
I+Mix+SL ₁	29	47,2	3,27	2,96	0,33	-	0,30
	49	48,6	4,04	3,28	0,41	0,376	0,33
I+Mix+SL ₂	29	49,3	3,27	3,12	0,36	-	0,34
	49	62,6	3,93	3,10	0,43	0,274	0,34

I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite

Este comportamento pode ser justificado pela sinergia positiva estabelecida entre os substratos, devido ao suplemento em nutrientes deficitários no substrato principal, bem como pela redução de efeitos inibitórios ao processo (Kassuwi *et al.*, 2012). A investigação realizada por Jelen (2002) reforça esta observação, na medida em que refere que o soro é relativamente

rico em cálcio, fósforo, sódio e potássio, o que complementa o déficit verificado por Callaghan (2002) nos subprodutos hortofrutícolas em alguns destes minerais.

Avaliando o volume de metano produzido por CQO removido no dia 49, constatou-se que o volume registado na mistura I+Mix ($0,263 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{CQO}_r$) foi semelhante ao da mistura I+Mix+SL₂ ($0,274 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{CQO}_r$), contudo inferiores à mistura I+Mix+SL₁ que apresentou o melhor rendimento ($0,376 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{CQO}_r$). Tendo em conta que o máximo teórico em processos de digestão nestas condições é de $0,350 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{CQO}_r$, conclui-se que os resultados obtidos foram bastante satisfatórios.

Embora a unidade com SL₂ tenha apresentado uma remoção em CQO superior à que continha SL₁ (62,6% vs 48,6%), essa remoção não foi tão efetiva por não se ter traduzido numa maior produção de metano. Consequentemente, o rendimento em CH₄ obtido na unidade I+Mix+SL₂ é inferior à I+Mix+SL₁.

A Tabela 26 apresenta os principais resultados nos rendimentos em biogás e metano obtidos na digestão anaeróbia de subprodutos hortofrutícolas por diversos autores, os quais podem ser comparados com os obtidos no ensaio realizado (Tabela 25).

Bouallagui (2009) avaliou o processo de digestão de uma mistura de substratos semelhante à estudada (curgete, alface, tomate, maçã, laranja, pera, batata e cenoura + subproduto complementar) tendo verificado um rendimento em biogás por SV iniciais de $0,32 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_i$, ligeiramente inferior aos obtidos para todas as misturas estudadas neste trabalho em qualquer um dos dias em análise. Por sua vez, Kavitha e Joseph (2007) obtiveram um rendimento em biogás superior para uma mistura de subprodutos vegetais ($0,39 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_i$), próximo do rendimento obtido nas misturas com soro no último dia do ensaio.

No que se refere aos rendimentos em metano por SV_i da massa em digestão obtidos para o dia 29 ($0,27 - 0,34 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_i$) e para o dia 49 ($0,28 - 0,34 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_i$) estes encontram-se dentro da gama de valores reportados por outros autores ($0,22-0,68 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_i$).

Tabela 26. Produção de biogás por digestão anaeróbia de subprodutos hortofrutícolas.

Tipo de substrato	Tipo de reator/ Condições	Y Biogás	Y Metano	Referência
Subprodutos de frutas e vegetais: espinafre, espargos, feijão morango, maçã, cenoura e pera	Contínuo 1 L	-	0,22; 0,34; 0,26 0,31; 0,28; 0,42 e 0,31 L CH ₄ .g ⁻¹ SV _i respectivamente	Knol, 1978
Subprodutos de frutas e vegetais: abacate, milho, maçã, espargos e ananás	Contínuo 10 L	-	0,29; 0,27; 0,23; 0,23 e 0,34 L CH ₄ .g ⁻¹ SV _i respectivamente	Lane, 1979
Subprodutos de batata e folhas de cana-de-açúcar	Erlenmeyers 0,5 L	-	0,42 L CH ₄ .g ⁻¹ SV _r para digestão independente de subprodutos de batata e 0,55-0,68 L CH ₄ .g ⁻¹ SV _r para a co-digestão de subprodutos de batata e de cana-de-açúcar	Parawira <i>et al.</i> , 2004
Mistura de subprodutos vegetais	Garrafas de vidro 1,5 L; temperatura ambiente.	0,39 L.g ⁻¹ SV _i	0,27 L CH ₄ .g ⁻¹ SV _i	Kavitha e Joseph, 2007
Mistura de subprodutos frutas e vegetais (curgete, alface, tomate, maçã, laranja, pera, batata e cenoura + subproduto complementar)	Reator 2 L; 35°C.	0,32 L.g ⁻¹ SV _i	-	Bouallagui, 2009

Rendimento em gás dos subprodutos. Considerando apenas a matéria orgânica proveniente do substrato no processo de digestão (Mix, Mix+SL₁ e Mix+SL₂), através da anulação do efeito do inóculo, determinaram-se os rendimentos em biogás e metano produzidos para o dia 29 e 49 do ensaio (Tabela 27).

Para a mistura I+Mix, no dia 29, obteve-se um rendimento de 1,33 L em biogás por litro de Mix em digestão. Por sua vez, os melhores rendimentos obtiveram-se nas misturas com substratos complementares com valores de 3,28 L e 3,24 L em biogás por litro de Mix+SL₁ e Mix+SL₂, respectivamente. O mesmo se verificou nas determinações referentes ao dia 49. É ainda possível constatar que no final do ensaio os rendimentos de biogás por litro de substrato foram superiores aos de dia 29.

Ao contrário do que acontece com a produção de biogás, os rendimentos em metano foram superiores no dia 29 quando comparados com os valores obtidos no fim do ensaio. As misturas que continham soro apresentaram, uma vez mais, os melhores rendimentos referentes à produção de metano por litro de substrato em degradação, comparativamente com a mistura que continha apenas Mix como substrato.

Tabela 27. Rendimento do processo (substrato em digestão)

ID Mistura	Dia	Biogás (L.L ⁻¹)	CH ₄ (L.L ⁻¹)
I+Mix	29	1,33	1,70
	49	3,64	0,96
I+Mix+SL ₁	29	3,28	4,74
	49	8,43	4,11
I+Mix+SL ₂	29	3,24	5,98
	49	7,50	5,54

I – Inóculo; Mix – Mistura de subprodutos; SL – Soro Leite

Com base nos rendimentos determinados assume-se como de maior interesse o dia 29, ou seja, o final do processo é considerado após decorrido ca de um mês.

Potencial energético dos subprodutos hortofrutícolas

O interesse do biogás como recurso energético deve-se ao seu principal constituinte, o metano, o qual possui um elevado poder calorífico e que torna a sua queima para a produção combinada de energia térmica e energia elétrica (cogeração) muito oportuna.

De forma a prever uma possível aplicação do biogás produzido num processo de cogeração considerou-se a totalidade dos subprodutos mensais gerados pela indústria caracterizada (138 t/mês laborado – 23 dias úteis, cf 5.1.2.1.) e os rendimentos do processo de digestão anaeróbia obtidos para a mistura I+Mix (Tabela 25).

No processo de cogeração explorado foi considerada a utilização de um conjunto motor-gerador, para o qual 1 m³ de CH₄ apresenta um potencial associado de 9,4 kWh, dos quais 30% correspondem a uma conversão em energia elétrica e 65% em energia térmica. A recuperação do calor neste processo é geralmente realizada através de permutadores que recuperam, na forma de um fluído quente, a energia térmica dos circuitos de arrefecimento do motor, do óleo de lubrificação e dos gases de escape. As perdas associadas ao processo de cogeração são apenas de ca de 5% (Figura 28).

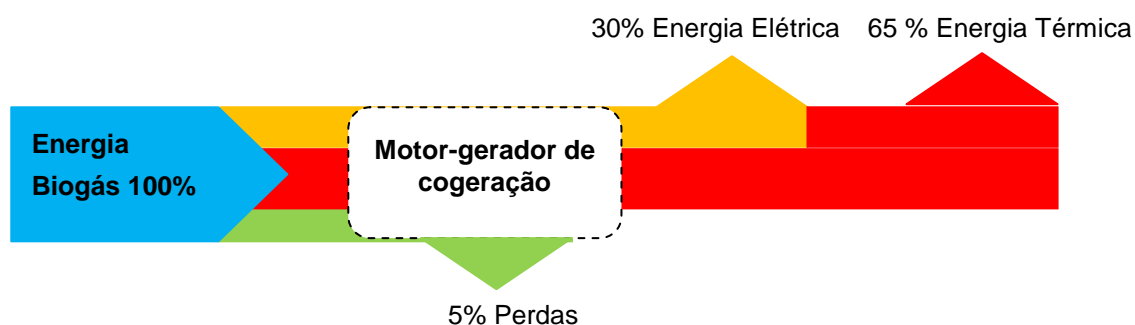


Figura 28. Balanço energético do processo de cogeração

Na Figura 29 encontra-se esquematizada a potencial produção de eletricidade e calor pelo processo de cogeração aplicado na valorização dos subprodutos hortofrutícolas.

Assumindo as condições referidas é possível obter ca de 374 m³/mês de metano para a totalidade de subprodutos hortofrutícolas mensais gerados. Para o processo de codigestão considerado obtêm-se um potencial energético de 3515 kWh/mês, isto é, ca de 153 kWh/ dia, considerando os 23 dias úteis laborados na fábrica. Da totalidade de energia produzida, 46 kWh/dia correspondem a energia elétrica e 99 kWh/dia a energia térmica.

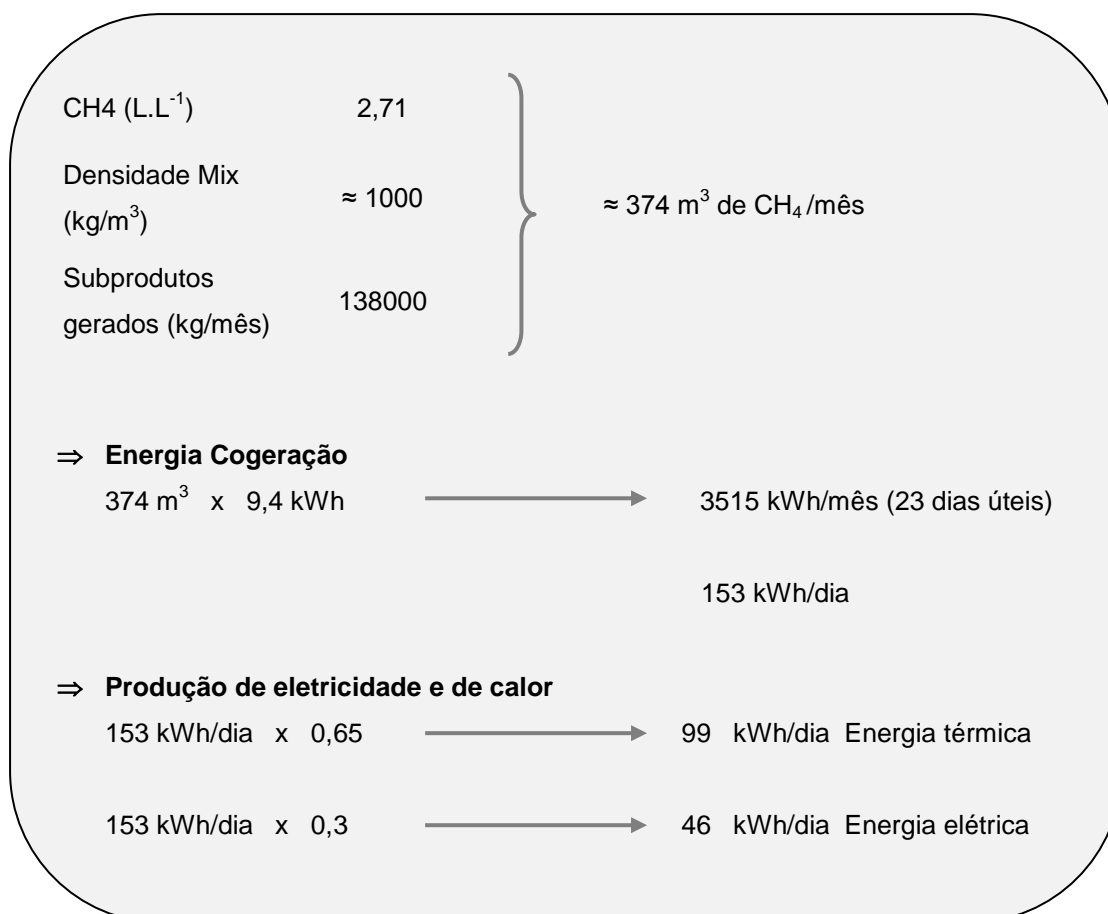


Figura 29. Potencial de produção de energia na fábrica por cogeração

É ainda de referir que, nos potenciais energéticos calculados apenas foi considerada a mistura I+Mix uma vez que não foram determinadas as quantidades médias mensais de soro de leite geradas na respetiva indústria, visto não se encontrar no âmbito deste trabalho. Contudo, tendo em conta que os rendimentos obtidos no processo de digestão anaeróbia são superiores nas misturas complementadas com soro de leite, é espectável que o potencial de produção de energia para este tipo de misturas seja superior comparativamente ao obtido para a I+Mix.

Simulando a aplicação da energia elétrica diária produzida (46 kWh/dia), por exemplo, num equipamento de potência 2,95 kW (Máquina de Corte – TranSlicer 2000 ® Urschel) seria possível obter uma autonomia de 15,5 horas de trabalho.

5.2.4. Conclusões intercalares

As misturas de subprodutos testadas apresentaram características que favorecem o respetivo tratamento e valorização pelo processo de digestão anaeróbia.

- ⇒ Com base na representatividade das diferentes classes de subprodutos gerados na fábrica, foi possível estabelecer uma mistura tipo formulada com 30, 10, 20 e 40% dos subprodutos das classes I-Batata, II-Cenoura, III-Frutos, IV-Folhas, respetivamente.
- ⇒ Todas as misturas testadas (I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂) revelaram produção de biogás nas condições de ensaio testadas (*batch*, 50 dias a 37°C), apresentando percentagens de metano de 60 a 70%.
- ⇒ Após ca de um mês de ensaio (29º dia) iniciou-se um período de oscilações na produção de biogás e consequentemente de metano. Com base nos resultados obtidos, o prolongamento do ensaio após este período é desprovido de interesse pois não ocorreu nenhum aumento significativo nos volumes de biogás e metano.
- ⇒ Ao 29º dia verificou-se que os maiores volumes de biogás produzidos por massa em digestão ocorreram nas misturas que continham substratos complementares (soro de leite), com 3,27 L.L⁻¹ para o I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂ vs 3,13 L.L⁻¹ para o I+Mix. Também os volumes em metano foram superiores para as misturas I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂ comparativamente à mistura I+Mix (2,71 L.L⁻¹, 2,96 L.L⁻¹ e 3,12 L.L⁻¹, respetivamente). Os resultados obtidos não foram contudo conclusivos, sendo apenas possível verificar que as misturas que continham soro de leite apresentaram uma tendência positiva na produção de biogás.
- ⇒ Considerando apenas a matéria orgânica proveniente do substrato no processo de digestão (Mix, Mix+SL₁ e Mix+SL₂), através da anulação do efeito do inóculo, verificaram-se rendimentos em biogás de 1,33, 3,28 e 3,24 L e em metano de 1,70, 4,74 e 5,98 L por litro de substrato, para a I+Mix, I+Mix+SL₁ e I+Mix+SL₂, respetivamente.
- ⇒ Tendo em conta a totalidade de subprodutos hortofrutícolas mensais gerados de 138 t/mês, e considerando o rendimento da digestão de uma mistura I+Mix (2,71 L.L⁻¹ de metano), estima-se uma produção de 374 m³ metano/ mês na empresa.
- ⇒ Uma das potenciais aplicações do biogás é a produção conjunta de energia térmica e energia elétrica pelo processo de cogeração. Ponderando a aplicação de um processo de cogeração ao biogás produzido na fábrica, prevê-se uma produção total de 153 kWh/dia, dos quais 46 kWh na forma de eletricidade e 99 kWh de energia térmica.

III – CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. Conclusões

Os subprodutos provenientes de uma empresa de hortofrutícolas minimamente processados apresentaram potencial para a extração de compostos bioativos e para a produção de biogás.

Identificação e Caracterização do Potencial Bioativo dos subprodutos hortofrutícolas

- Foi caracterizado que no curso da atividade produtiva, a empresa de minimamente processados, alvo deste estudo, descarta em média cerca de 30% da totalidade das matérias-primas laboradas, o que representa um volume de subprodutos de ca de 138 t/mês, justificando-se assim a aplicação de tecnologias para a respetiva valorização económica.
- De entre as quatro classes de subprodutos consideradas (Batata, Cenoura, Frutos e Folhosas), as mais representativas em termos de volume, foram a das Folhosas (55,2 t / mês) e a da Batata (42,8 t / mês), correspondendo a 40% e 30% do total de subprodutos, respetivamente.
- A composição de todas as classes de subprodutos caracterizou-se por possuir elevados teores de humidade (80-90%) que aliado à presença de nutrientes (orgânicos e inorgânicos) e à contaminação microbiológica, confere-lhes uma natureza altamente perecível, tal como era esperado. Para além disso a observação da alteração da cor – manifestada pelo escurecimento acentuado nos subprodutos, foi um sinal evidente da continuidade de alterações de oxidação enzimática. Este facto perspetiva a necessidade de introduzir processos prévios de concentração e / ou descontaminação, nos processos de extração para a recuperação de compostos bioativos.
- De entre as classes consideradas a dos Frutos e das Folhosas foram as que demonstraram ser mais promissoras enquanto matrizes para a recuperação de compostos bioativos antioxidantes, veiculando 329 ± 26 mg ET.100 g⁻¹ e 205 ± 38 mg ET.100 g⁻¹ de compostos fenólicos totais, respetivamente.

Digestão anaeróbia: valorização dos subprodutos pela produção de biogás

- Nas condições de digestão anaeróbia ensaiadas (batch, 50 dias, 37°C) foi verificada a produção de biogás nos três tipos de misturas (substrato + inoculo) testadas (I+Mix, I+Mix+SL1 e I+Mix+SL2).
- Na composição do biogás, o metano foi o componente mais representativo, com valores entre 60 a 70%, seguindo-se o dióxido de carbono a variar entre 20 e 30%, independentemente do tipo de substrato digerido.

- A produção de biogás só revelou eficiência até ao 29º dia, independentemente do tipo de substrato digerido. Os volumes de biogás produzidos por massa em digestão ao 29º dia foram, por ordem decrescente, de 3,27 L.L-1 para o I+Mix+SL1 e I+Mix+SL2 e, de 3,13 L.L-1 para o I+Mix. No entanto, a produção de biogás posterior dia essa data demonstrou comportamentos distintos em função do tipo de substrato testado, sugerindo-se um comportamento mais vantajoso para as misturas que incluíram soro de leite como substrato complementar. Esta tendência não tendo sido conclusiva deverá ser avaliada em estudos posteriores.
- Considerando o rendimento em metano obtido na digestão anaeróbia (I+Mix) estima-se uma produção de 374 m³ metano/ mês na empresa face ao volume total de subprodutos gerados (138 t/mês). O aproveitamento total do biogás produzido através da aplicação de um processo de cogeração, pode traduzir-se numa capacidade energética total de 153 kWh/dia, dos quais 46 kWh sob a forma de eletricidade e 99 kWh em energia térmica.

7. Linhas de investigação futura

Como propostas futuras de investigação propõe-se o aprofundamento das seguintes questões:

Identificação e Caracterização do Potencial Bioativo dos subprodutos hortofrutícolas

⇒ Caracterização qualitativa da composição biativa

Da avaliação dos teores totais de compostos fenólicos e carotenóides nas diferentes classes de subprodutos, conclui-se que as classes dos Frutos e das Folhosas possuem quantidades expressivas destes, com capacidade antioxidante. Assim, a confirmação destas matérias vegetais, enquanto matrizes para a extração de fitoquímicos antioxidantes obriga a posterior caracterização qualitativa, por forma a identificar e quantificar a natureza específica dos compostos veiculados. Esta avaliação é efetuada através da análise dos respetivos perfis, fenólico e carotenóide, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

⇒ Avaliação de processos de extração

Deverão ser realizados estudos com a finalidade de otimizar os processos de extração através duma seleção criteriosa das técnicas disponíveis, designadamente de processos de extração convencional e de extração supercrítica. A eficiência destes é condicionada quer pela natureza do composto a extrair, quer pelos custos industriais associados. A título de exemplo, na extração por técnicas convencionais são necessários ponderar muitos fatores, tais como a polaridade do solvente utilizado (água, etanol, éter e metanol), o tempo e a temperatura de extração com vista a minimizar a perda de compostos bioativos. No entanto apesar de eficientes, estes métodos, podem ter impactos negativos no ambiente devido aos resíduos

gerados pela utilização de solventes tóxicos. Por outro lado, a extração supercrítica garante á partida um bom rendimento de extrato com preservação das propriedades antioxidantes, mas pode, no entanto, não ser uma alternativa eficiente para substâncias de elevada polaridade, para além de associar custos industriais elevados.

Digestão anaeróbia: valorização dos subprodutos pela produção de biogás

⇒ Avaliação de diferentes concentrações do substrato Mix e complementaridade com Soro de leite

A avaliação de diferentes concentrações do substrato por digestão anaeróbia em *batch* referente à mistura de subprodutos hortofrutícolas (Mix) prevê ser um estudo futuro, na medida em que permite otimizar a valorização dos subprodutos gerados pela empresa, através do aumento da eficiência do processo. Relativamente à complementaridade com soro de leite, os resultados obtidos no trabalho efetuado foram inconclusivos, contudo, prevendo-se uma tendência no aumento da eficiência do processo é de interesse o estudo da referida complementaridade a diferentes concentrações de soro de leite.

⇒ Acerto de pH

No processo de digestão anaeróbia realizado o pH do meio foi corrigido. É de interesse avaliar a necessidade de acertos de pH para este tipo de substratos, por forma a determinar um procedimento que evite esta operação. A aplicação de substratos complementares com o intuito de eliminar esta etapa preliminar do processo revela-se um trabalho futuro com interesse.

⇒ Processo em contínuo

No presente trabalho a digestão anaeróbia foi realizada em *batch* pelo que a avaliação da digestão de subprodutos hortofrutícolas num processo contínuo é de interesse relevante, com o intuito de se verificar se a eficiência do processo é mantida. A importância deste estudo é acrescida pelo facto de ser o processo de digestão em contínuo o que mais se irá aproximar das condições de operação reais no caso de implementação na empresa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi T., Tauseef S.M., Abbasi S.A. (2012). Anaerobic digestion for global warming control and energy generation - an overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: 3228 – 3242.
- AEBIOM (2009). A Biomass road map for Europe. European Biomass Association.
- AEP (2011). Manual de Gestão de Resíduos Industriais. Associação Empresarial de Portugal.
- Ahluwalia, S., Shivhare, U. S. e Base, S. (2013). Supercritical CO₂ Extraction of compounds with antioxidant activity from fruits and vegetables waste – a review. *Focusing on Modern Food Industry*. 2(1):43-62.
- Alegria, C. (2007). Processos de descontaminação alternativos em cenoura minimamente processada: natureza dos tratamentos e local de aplicação. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências e Engenharia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. pp.119.
- Alegria, C., Pinheiro, J., Duthoit, M., Gonçalves, E.M, Moldão-Martins, M. e Abreu, M. (2012). Fresh-cut carrot (cv. Nantes) quality as affected by abiotic stress (heat shock and UV-C irradiation) pre-treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2):197-203.
- Alves, S., Negreiros, M., Aroucha, E., Lopes, W., Teófilo, T., Freitas, F. e Nunes, G. (2010) Qualidade de cenouras em diferentes densidades populacionais. *Revista Ceres* 57(2): 218-223.
- Andrade, M., Viana, E., Sousa, F., Junghans, D., Sousa, M. e Jesus, J. (2011). Caracterização física e físico-química de cultivares e de híbridos e abacaxi desenvolvidos pela Embrapa. 5ª Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- APHA, AWWA e WEF. (1999). *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Appels, L., Lauwers, J., Degreè, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Impe, J. V. E Dewil, R. (2011). Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potencial and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15(9):4295-4301.
- Arabbi, P.R. (2001). Alimentos funcionais: aspectos gerais. *Nutrire: Revista Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. 27:87-102
- Argenta, L.C. e Mondardo, M. (1994) Maturação na colheita e qualidade de maçãs 'Gala' após a armazenagem. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, 6(2):135-140.
- Arnao, M.B., Cano, A. e Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73: 239–244.
- Arvanitoyannis, I. S. e Varzakas, T. H. (2008). Vegetable waste treatment: comparison and critical presentation of methodologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(3): 205-247.
- Ayala-Zvala, J., Rosas-Domínguez, C., Veja-veja, V. e González-Aguilar, G.A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: Cooking for integral exploitation. *Journal of Food Science*. 75(8):175-181.
- Benelli, P., Riehl, C. A. S. , Smania, A., Smaniac, E.F.A. e Ferreira, S.R.S. (2010). Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SCFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *Journal of Supercritical Fluids* 55(1):132-141.
- Bengozi, F., Sampaio, A., Spoto, M., Mischon, M. E Pallamin, M. (2007). Qualidades físicas e químicas do abacaxi comercializado na CEAGESP São Paulo. *Revista Sociedade Brasileira de Fruticultura*. 29(3):540-545.

- Benner R., Maccubbin A. E. e Hodson R. E. (1984). Anaerobic Biodegradation of the Lignin and Polysaccharide Components of Lignocellulose and Synthetic Lignin by Sediment Microflora. *Applied and environmental Microbiology*, 47(5):998-1004.
- Berardino, D. S., Costa, S. e Converti, A. (2000). Semi-continuous anaerobic digestion of a food industry wastewater in an anaerobic filter. *Bioresource Technology*, 71, 261.
- Bolin, H.R e Huxsoll, C.C. (1991). Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *Journal of Food Science*. 56(2):416-418.
- Botheju D., Bakke R. (2011). Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. *The Open Waste Management Journal*. 4:1-19.
- Bouallagui, H., Cheikh, R.B., Marouani, L., Hamdi, M. (2003). Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in tubular digester. *Bioresource Technology*. 86:85–89.
- Bouallagui, H., Lahdheb, H., Romdan, E. B., Rachdi, B. e Hamdi, M. (2009). Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition. *Journal of Environmental Management* 90(5):1844-1849.
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Cheikh, R.B. e Hamdi, M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*, 40:989-995.
- Buffiere P., Loisel D., Bernet N. e Delgenes J.P. (2006) Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology*. 53:233–241.
- Bushway, R.J. e Wilson, A.M. (1982). Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 15:165-169.
- Callaghan, F.J., Wase, D.A.J., Thayanithy, K. e Forster, C.F. 2002. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy*, 22(1):71-77.
- Campos, L.S. (2005). Entender a Bioquímica. 4ª edição. Escolar editora. Lisboa.
- Cardoso, A.S. (2003). Corantes e pigmentos. In: Castro, A.G. (ed.) *A química e a reologia no processamento dos alimentos*. Instituto Piaget. Lisboa. pp 239-262.
- Carlsson M., Lagerkvist A. e Morgan-Sagastume F. (2012). The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*, 32(9):1634-1650.
- Cavaleiro, L., Gonçalves, M. e Mendes, B. (2011). Valorização de resíduos da indústria de transformação de batata.
- CCE – Centro para a Conservação de Energia (2000). Guia Técnico de biogás. Centro para a Conversão de Energia, ISBN 972 852 12 19 Lisboa. Portugal.
- Chang, S., Tan, C., Frankel, E. N. e Barrett, D. M. (2000). Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2):147-151.
- Chulhwan, P., Chunyeon, L., Sangyong, K., Yu, C., Howard, C.H. (2005). Upgrading of anaerobic digestion by incorporating two different hydrolysis processes. *J. Bioscience Bioeng.* 100: 164–167.
- Chun Y., John, S., Sophia, J.X., J. Yueming, e. Dong, L., (2009). Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity. *Food Chemistry* 113(4):1088-1094.
- Concannon, F., Golden, T., Geoghegan, F., Crumlish, B., Killilea, E., Henry, M., Coates, J. (1992). Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and

determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Water Science And Technology*. 25 (7): 31-40.

Coombs J. (1990). The present and future of anaerobic digestion. In Wheatley A. (Eds) *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*. Elsevier science publishers Lds, Londres.

Crozier, A, Lean, M.E.J., Morag, S.M. e Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of Commercial Tomatoes Onions. Lettuce and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:590-595.

Dafne (sd). "Produtos de Colorimetria - fundamentos". In: Alegria, C.S.M. (2007). *Processos de descontaminação alternativos em cenoura minimamente processada: natureza dos tratamentos e local de aplicação*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências e Engenharia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. pp.119.

De Baere L. (2006). Will anaerobic digestion of solid waste survive in the future? *Water Science and Technology*. 53(8):187-194.

Decreto Lei nº73/2011 - Regime geral da gestão de resíduos. Diário da República nº116 Série I de 17/06/2011.

Deng, G., Shen, C., Xu, X., Kuang, R., Guo, Y., Zeng, L., Gao, L., Lin, X., Xie, J., Xia, E., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W. e Li, H. (2012). Potential of Fruit Wastes as Natural Resources of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 13:8308-8323.

Desorby, S.A., Netto, F.M. e Labuza, T.P. (1998). Preservation of β -Carotene from Carrots. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38:381-396.

Deublein D. e Steinhauser A. (2008). *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

DGEG (2010). *Renováveis. Estatísticas Rápidas*. Julho de 2010. Direcção Geral de Energia e Geologia, Lisboa.

Djilas, S. e Canadanovic-Brunet, G. C. (2009). By-product of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry & Engineering Quarterly* 15(4):191-202.

Duarte, C. L., Esteves, M.P., Carvalheiro, F., Vicente, P. e Gírio, Francisco. (2007) Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. In: *Revista de Engenharia Química*. 5:56-62.

El-Mashad, H.M., Wilko, K.P., Loon, V., Zeeman, G. (2003). A model of solar energy utilisation in the anaerobic digestion of cattle manure. *Biosyst. Eng.* 84: 231–238.

EurObserv'ER (2010). *Biogas Barometer*. Le journal des énergies renouvelables. 200:112-113.

FAO, (2010). *Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide*.

Fernandez, J., Perez, M., Romero, L.I. (2008). Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Bioresour. Technol.* 99: 6075–6080.

Ferreira, M. (2010). *Viabilidade técnico-económica do aproveitamento de biogás*. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Qualidade e Gestão do Ambiente. Universidade de Évora.

Ferreira, M., Marques, I. P. e Malico, I. (2012). Biogas in Portugal: Status and public policies in a European context. *Energy Policy*. 43: 267-274.

FIPA (2007) *Subprodutos e resíduos*. Boletim Informativo da Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares. 95

- Garardi M.H. (2003). *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Garcia-Pena, E.I., Parameswaran, P., Kang, D.W., Canul-Chan, M. e Krajmalnik-Brown, R. (2011). Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: process and microbial ecology. *Bioresource Technology*. 102(20):9447-55.
- Gębczyński, P. (2006). Content of selected antioxidative compounds in raw carrot and in frozen product prepared for consumption. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 9(3)
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I. e Marvris, V. (2007). Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renewable Energy*. 32(13):2147-2160.
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D.S. e Kapoor, H.C. (2004). Antioxidants in tomate (*Lycopersium esculentum*) as a fuction of genotype. *Food Chemistry* 84(1):45-51.
- Ghafoor, K., Park, J., e Choi, H.Y. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(3):485-490.
- Ghaly, A.E. e Ramkumar, D.R. (1999). Controlling the pH of acid cheese whey in a two-stage anaerobic digester with sodium hydroxide. *Energy Sources*. 21(6):475-502.
- Gonçalves, M.R., Freitas, P. e Marques, I.P. (2012). Bionenergy recovery from olive mil effluent in a hybrid reactor. *Biomass and Bioenergy*. 39:253-260.
- Goni, I. e Hervert-Hernández, D. (2011). By-products from plant foods are sources of dietary fibre and antioxidants. In Rasooli, I. (Ed), *Phytochemicals – Bioactivities and Impact on Health*. Agricultural and Biological Sciences. 95-116
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y. S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I. e Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*. 74(3):309-316.
- Guttler, J. (2012). Casein whey as booster for anaerobic co-gestion of primary sludge. A thesis presented for the requirements for the degree of Master of Engineering in Environmental Engineering. Institute of Technology and Engineering, College of Science, Massey University. New Zealand. pp. 167.
- Hans, K. e Cosima, S. (1994). Three-phase anaerobic digestion of organic wastes. *Water Science Technology*. 30: 367-374.
- Hansen, C. L. e Cheong, D. Y. (2007). *Fermentation, biogas and biohydrogen production from solid food processing*. Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.
- Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurements of total phenolics. In: Harborne J.B. Ed., *Plant Phenolics. "Methods in Plant Biochemistry Series"*: Academic Press. Londres. 1: 1-28.
- Hernandez-Berriel, M.C., Benavides, L.M., Perez, D.J.G., Delgado, O.B., (2008). The effect of moisture regimes on the anaerobic degradation of municipal solid waste from Metepec (Mexico). *Waste Manage*. 28: 14–20.
- Holm-Nielsen, J. B., Seadi, T. A., Oleskowicz-Popiel, P. (2009). The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*. 100: 5478-5484.
- Igoni, A. H., Ayotamuno, M. J., Eze, C. L., Ogaji, S. O. T. e Probert, S. D. (2008). Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste. *Applied Energy*. 85(6): 430-438.
- INE, I.P. (2010). *Estatísticas da Produção Industrial 2008*. Lisboa-Portugal.

- Jelen, P. (2002). Whey Processing. Utilization and Products. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, H. Roginski, J. Fuquay, P. Fox (Eds.), Elsevier Science Publishers Ltd. Oxford, pp.2739-2745.
- Jimenez-Escrig, A., Rincon, M., Pulido, R. e Saura-Clixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guava* L.) as a new source of antioxidante dietary fiber. Journal of Agricultural Food Chemistry 49(11):5489-5493.
- Kagaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F. e Debevere, J. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. Food Quality and Preference. 15:259-270.
- Kassuwi S. A. A., Mshandete A. M. e Kivaisi A. K. (2012). Anaerobic Co-Digestion of Biological Pre-Treated Nile Perch Fish Solid Waste with Vegetable Fraction of Market Solid Wast. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 7(12).
- Knol, W., Van Der Most, M. M. e De Waart, J. (1978). Biogas production by anaerobic digestion of fruit and vegetable waste. A preliminary study. Journal of the Science Food and Agriculture. 29(9):822-830.
- Lamin, S.K., John, S. e Gauri, S.M. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model." Separation and Purification Tech. 60:278-284.
- Lane, A. G. (1979). Methane from anaerobic digestion of fruit and vegetable processing waste. Food Technology in Australia. 31: 201-207.
- Larrauri, J. A., Rup  rez, P., Borroto, B. e Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization. Lebensmittel-Wissenschaft UndTechnologie 29(8):729-733.
- Lastella, G., Testa, C., Cornacchia, G., Notornicola, M., Voltasio, F., Sharma, V.K. (2002). Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. Energy Conserv. Manage. 43: 63–75.
- Lata, K., Rajeshwari, K.V., Pant, D.C., Kishore, V.V.N. (2002). Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of tea and vegetable market wastes. W. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 589–592.
- Laufenberg, G., Kunz, B. e Neystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. Bioresource Technology. 87:167-198.
- Li,Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. e Cheng, S. (2005). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chemistry 96(2):254-260.
- Liu, C., Yuan, X., Zeng, G., Li, W., Li, J., 2008. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. Bioresources Technology 99: 882–888.
- Lorach, R., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. e Ferreres, F. (2003a). Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) by-products as a source of antioxidant phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(8):2181-2187.
- Lorach, R., Tomas-Barberan, F.A. e Ferreres, F. (2003b). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(16):5109-5116.
- Macedo, A. (2010). Fraccionamento de Lactossoro de Ovelha por Tecnologias de Membranas e Estudos das Poss  veis Utiliza  es dos Concentrados obtidos. Disserta  o para a obten  o do grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial. Universidade T  cnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. pp.414
- Marques I.P., Teixeira, A., Rodrigues, L., Martins Dias, S., Novais, J.M. (1998). Anaerobic treatment of olive mill wastewater with digested piggery effluent. Water Environ. Research. 70 (5):1056-1061.
- Marques, I.P. (2001). Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. Desalination. 137: 233-239.

- Marques, I.P., Teixeira, A., Rodrigues, L., Martins Dias, S, Novais, J.M. (1997). Anaerobic co-treatment of olive mill and piggery effluents. *Environ. Technology*. 18: 265-274.
- Martin, A. M. (Ed.) (1998). *Bioconversion of waste materials to industrial products*, 2ª Edição. Blackie Academic & Professional, Londres.
- Mata-Alvarez J., Mace, S. e Llambres, P. (2000). Anaerobic digestion of solid wastes. An overview os research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. 74:3-16.
- Mitra, P., Ramaswamy, H.S., e Chang K.S. (2009). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. *Journal of Food Engeniering*. 95:208–213.
- Mumme, J., Linke, B., Tölle, R. (2010). Novel upflow anaerobic solid-state (UASS) reactor. *Bioresour. Technol.* 101: 592–599.
- Nagao, N., Tajima, N., Kawai, M., Niwa, C., Kurosawa, N., Matsuyama, T., Yusoff, F.M. e Toda, T. (2012). Maximum organic loading rate for the single-stage wet anaerobic digestion of food waste. *Bioresource Technology*. 118:210–218.
- Novais, J. M. e Marques, F. O. (2002). Biogás – Fórum Energias Renováveis em Portugal (Gonçalves, H., Joyce, A., Silva, L.; Eds.). ADENE/INETI. Lisboa. 120-127
- NP - 784. (1970). Sumos de frutos e derivados. Determinação do resíduo seco total, solúvel e insolúvel. *Processos de referência*.
- Okarter, N., e Liu, R. H. (2010). Health beneficts of whole grain phytochemicals. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. 50(3):193-208.
- Oliveira, L. C. (2005). *Digestão Anaeróbia: Uma visão sustentável no tratamento de subprodutos de origem animal*. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores.
- Ostrem, K. e Themelis, Nickolas J. (2004). *Greening Waste: Anaerobic Digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes*. Dissertation for M.S. in Earth Resources Engineering. Department of Earth and Environmental Engineering Fu Foundation of School of Engineering and Applied Science, Columbia University.
- Parkin, G. F., Owen, W.F. (1986) *Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges*. *Journal of Environmental Engineering*. 112 (5): 867-920.
- Pérez-Conesa, D., Garcia-Alonzo, J., Garcia-Valverde, V., Dolores, M. D., Jacob, K., Sánches-Siles, L., Ros, M. G.; Periago, M. J. (2009). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and Thermal processing of tomato puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- Pesta, G., Meyer-Pittroff, R., Russ, W. (2007). Utilization of whey. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, V. Oreopoulou, W. Russ (Eds) Springer, 193-207.
- Pettus, A. (2009). *Methane: Tapping the Untapped Potential*. Clean Air Task Force. Disponível em: www.catf.us/resources/whitepapers/files/Methane-Tapping_the_Untapped_Potential.pdf. Acedido em: 14/08/2013
- Pineli, L.L.O., Moretti, C., Almeida, G., Onuki, A., Nascimento, A. (2005). Caracterização química e física de batatas 'Ágata' minimamente processadas, embaladas sob diferentes atmosferas modificadas ativas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40(10):1035-1041

- Pinelo M., Rodriguez A.R., Sineiro J., Senorans F.J., Reglero G., e Nunez M.J. (2007). Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *European Food Resource Technology*. 226:199–205.
- Pinto, F. J. (Ed.) (2010). *Nutraceúticos e Alimentos Funcionais*, 1ª Edição. Lidel – Edições Técnicas. pp.276
- Raposo F., De la Rubia M.A., Fernández-Cegri R., Borja R. (2011). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yield and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16:861-877.
- Raynal, J., Delgenès, J. P. e Moletta, R. (1998). Two-phase anaerobic digestion of solid wastes by a multiple liquefaction reactors process. *Bioresource Technology*. 65(1-2):97-103.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J. e Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonóides and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(7):933-956.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (1997). Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, pp. 93.
- Sampaio, M. A., Gonçalves, M. R., Marques, I. P. (2011). Anaerobic digestion challenge of raw olive mill wastewater. *Bioresource. Technology*. 102 (23):10810-18.
- Schaub, S. M., e Leonard, J. J. (1996). Composting: an alternative waste management option for food processing industries. *Trends in Food Science & Technology*. 7:263–268.
- Schieber, A., Shintzing, F.C. e Carle, R. (2001). By-products of plants food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*. 12(11):401-413.
- Shi J., Khatri, M., Xue S. J, Mittal, G. S., Ma Y. e Li D. (2009). Solubility of lycopene in supercritical CO₂ fluid as affected by temperature and pressure. *Separation and Purification Technology*. 66:322–328.
- Shilpi, A., Shivhare, V.S. e Basu, S. (2013). Supercritical CO₂ Extraction of compounds with Antioxidant Activity from fruits and vegetables waste – a review. *Focusing on Modern Food Industry*. 2(1):43-62.
- Silva, E., Ferreira, R., Neto, S., Tavella, L. e Solino, A. (2011) Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. *Horticultura Brasileira*. 29(2):242-245.
- Someya, S., Yoshiki, Y. e Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry*. 88(3):441-447.
- Srilatha, H.R., Krishna, N.; Sudhakar, B. K. E Madhukara, K. (1995). Fungal pretreatment of Orange processing waste by solid state fermentation for improved production of methane. *Process Biochemistry*. 30: 327-331
- Stahl, W. e Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenóides: a review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1740:101-107.
- Swain, T. e Hillis, W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.1: 63-68.
- Talcott, S. T., Howard, L. R., e Brenes, C. H. (2001) Factors contributing to taste and quality of commercially processed strained carrots. *Food Research International*. 34:31-38.
- Tokuşoğlu, Ö. (2011). *Fruit and Cereals Bioactives*. Taylor and Francis Group, LLC. Nova York. pp. 472.
- Tomás-Barberán, F.A. e Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:853-876.

Toor, R. K. e Savage, G.P. (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*. 38(5):487-494.

VALUE (2012) - Guia para a Seleção das Melhores Técnicas Disponíveis de Valorização na Região do SUDOE. Intercâmbio e Transferência Tecnológica sobre a Valorização de Resíduos da Indústria de Transformados Vegetais do SUDOE.

Vasconcelos, E. (2005). Produtos minimamente processados. Dissertação. Universidade do Porto. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação. Porto. pp. 86.

Veeken, B. A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H. e Hamelers, B. (2000). Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. Cellulase and related enzymes. *Appl Biochemistry Biotechnology*. 30:165-183.

Verrier, D., Roy, F., Albagnac, G. (1987). Two-phase methanization of solid vegetable wastes. *Biological Wastes*. 22(3):163-177.

Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. (2008). Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* 99: 7928–7940.

Wognum, P.M. (Nel), Bremmers, H., Trienekens, J., Vorst, J. e Bloemhof, J. (2011). Systems for sustainability and transparency of food supply chains - Current status and challenges. *Advanced Engineering Informatics*. 25: 65-76.

Wolfe, K.L. e Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51(6):1676-1683.

MEDIAGRAFIA

http://www.alanrevista.org/ediciones/20042/importancia_nutricional_pigmentos_carotenoides.asp

<http://www.ragc.cesga.es/RRAGC/revista2009/quimica.html>

<http://www.fotosimagenes.org/imagenes/fenol-6.jp>

Anexo 1. Resultados do Conteúdo Fenólico Total, Conteúdo em Carotenóides Total e da Atividade Antioxidante para as diferentes classes de subprodutos

Tabela A1. Resultados médios (+DP) do Conteúdo Fenólico Total, Conteúdo em Carotenóides Total e da Atividade Antioxidante total e das frações de natureza hidrófila (AOxH) e lipofila (AOxL)

Classe de subprodutos	CFT mg ET.100 g ⁻¹	CCT mg β-caroteno 100 g ⁻¹	AOxH mg EAC.100 g ⁻¹	AOxL mg EAC.100 g ⁻¹	AOxT mg EAC.100 g ⁻¹
I - Batata	24,1 ^a ± 8,8	1,2 ^a ± 0,4	139,3 ^b ± 2,3	4,6 ^a ± 1,3	143,9 ^a ± 3,0
II - Cenoura	30,4 ^a ± 2,0	5,5 ^c ± 0,3	68,4 ^a ± 5,9	2,3 ^a ± 1,0	70,7 ^b ± 5,5
III - Frutos	204,9 ^b ± 38,2	4,7 ^b ± 0,9	72,7 ^a ± 11,1	9,1 ^b ± 1,2	150,4 ^a ± 18,1
IV - Folhosas	328,9 ^c ± 25,5	3,5 ^{bc} ± 0,5	122,4 ^b ± 16,6	27,9 ^c ± 2,8	81,8 ^b ± 10,1

Anexo 2. Calibração do Transdutor

O fator de calibração do transdutor foi determinado antes do início do ensaio de digestão anaeróbia, recorrendo a uma calibração, a qual foi realizada de acordo com o seguinte procedimento:

- Encheu-se completamente um frasco de 71 mL com água destilada e selou-se com uma rolha de borracha e uma cápsula de alumínio. Retiraram-se todas as bolhas de ar, substituindo-as por água.
- Retiraram-se exatamente 31 mL de água.
- Ventilou-se o frasco e procedeu-se à leitura da pressão atmosférica.
- Injetou-se 5 mL de ar no frasco e registou-se o valor de pressão em mV.
- Os dois procedimentos anteriores repetiram-se para valores entre 5 e 60 mL. Ao valor de pressão lido para cada volume de ar injetado subtraiu-se o valor obtido após ventilação do frasco.
- A representação gráfica da variação de pressão em mV em função do volume de ar injetado em 31 mL de headspace encontra-se na figura A2, a partir da qual se calculou o fator de correção (FC).

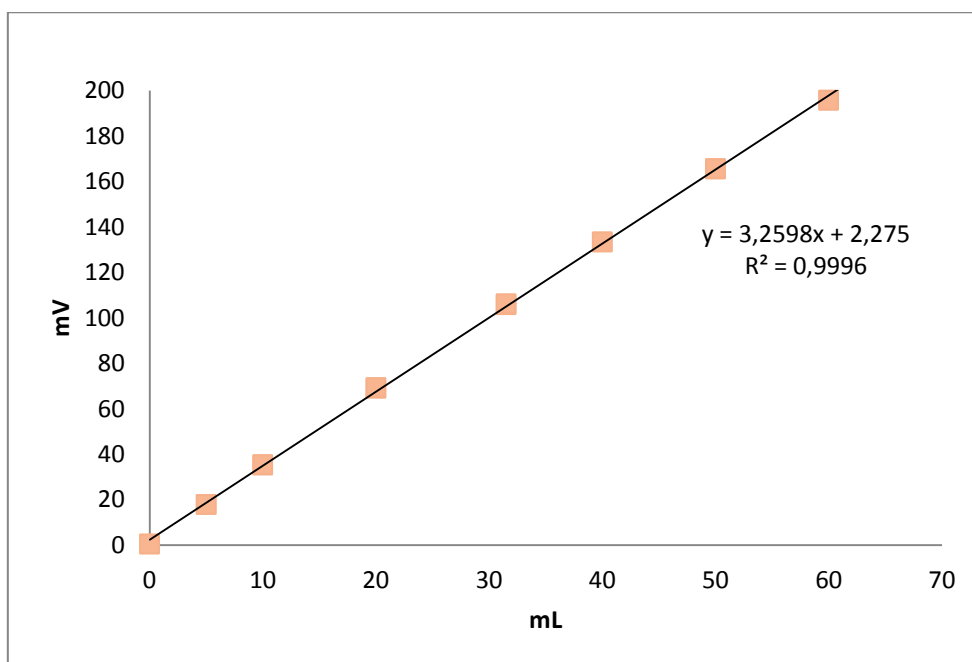


Figura A2. Curva de calibração do transdutor de pressão.

Idealmente, para a injeção de 31 mL de ar em 31 mL de headspace deve ler-se um valor de 100 mV. Contudo, pode haver um desvio desde valor, como se verifica, podendo ler-se 105,8 mV em vez de 100. Este desvio é contabilizado no FC, que contempla ainda a conversão dos valores medidos a 37°C para as condições normais de temperatura.

O fator de conversão foi calculado de acordo com a equação abaixo mencionada.

$$FC = \frac{100}{mV_mLheadspace} \times \frac{273}{(273+37)}$$

Obteve-se um FC igual a 0,83. Assim, a calibração foi feita de acordo com a expressão:

$$mL = (0,3068 \text{ mL} - 0,6979) \times 0,83$$